



Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik  
mit Schwerpunkt Kardiologie, Angiologie, Pneumologie  
der Medizinischen Fakultät Charité, Campus Mitte  
der Humboldt-Universität zu Berlin

## DISSERTATION

**Etablierung der Rasterkraftmikroskopie an  
kardiovaskulär relevanten Zellen, Proteinen und  
Materialien  
-Ein methodischer Ansatz-**

Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité  
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Herrn Christoph Richter

aus Jena

Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. K. Stangl  
2. Prof. Dr. med. H. Klein  
3. PD Dr. M. Pohl

Datum der Promotion: 20.Oktober 2003

Meinen Eltern

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Meilensteine der Entwicklung der optischen Theorie und Lichtmikroskopie	1
1.2	Mikroskopischer Fortschritt im 20. Jahrhundert	4
1.3	Entwicklung der „Atomic Force Microscopy“ - Geburtsstunde einer mikroskopischen Ära?	7
1.4	Rasterkraftmikroskopie in der kardiovaskulären Grundlagenforschung - Ein Überblick	13
2	Zielsetzung der Arbeit	15
3	Materialien und Methoden	18
3.1	Grundlagen der Rasterkraftmikroskopie	18
3.1.1	Prinzipieller Aufbau des AFM	18
3.1.1.1	PSI Autoprobe CP	19
3.1.2	Das lokale Experiment - Grundlage der verschiedenen Rastersondenmikroskope	21
3.1.3	Kräfte in der AFM	21
3.1.4	Die Scannereinheit	23
3.1.4.1	Design und Funktionsweise	23
3.1.4.1.1	Der piezoelektrische Effekt	24
3.1.4.1.2	Herstellung piezokeramischer Präzisionsscanner	25
3.1.4.2	Eigenresonanz, maximale Scanfrequenz- und geschwindigkeit	26
3.1.4.3	Nichtlineare Effekte	27
3.1.4.3.1	Intrinsische Nonlinearität	27
3.1.4.3.2	Hysterese	27
3.1.4.3.3	Alterungsprozesse („Aging“)	28
3.1.4.3.4	Elektrisches „Creeping“	29
3.1.4.3.5	Thermische Drift	29
3.1.4.3.6	Kreuzkopplung	30
3.1.4.3.7	Kombinierter Einfluss aller Nonlinearitätseffekte	30
3.1.4.3.8	Korrekturmöglichkeiten	31
3.1.4.4	Kalibrierung	31
3.1.4.4.1	Kalibrierstandards	32
3.1.5	AFM-Cantilever und Tips	33
3.1.5.1	Cantilever	33
3.1.5.2	AFM-Spitzen (Tips)	35
3.1.5.2.1	Pyramidale AFM-Tips	35
3.1.5.2.2	Konoidale AFM-Tips	36
3.1.5.2.3	Kontrollstandard zur Evaluierung der Tipgeometrie	38
3.1.6	AFM-Messumgebungen	39
3.1.6.1	Design der einfachen, offenen Flüssigkeitszelle	39
3.1.6.2	Kommerzielle, geschlossene, perfundierbare Flüssigkeitszelle	40
3.1.6.3	Temperiereinrichtung	40
3.1.6.4	Zubehör zur Optimierung der Messbedingungen	41
3.1.7	Messsignaldetektion	42
3.1.7.1	Positionssensitive Photodioden (PSPD)	42
3.1.8	Messsignalverarbeitung	43
3.1.9	Betriebsmodus	44
3.1.9.1	Kraft-Abstands-Kurven und ableitbare Funktionen	45
3.2	Probenpräparation	46



3.2.1	Kardiovaskuläre Zellen aus immortalen Zellkulturen	46
3.2.1.1	Bovine aortale Endothelzellen (BAEC)	46
3.2.1.2	Myozyten H9C2	47
3.2.2	Aortale Endothelzellen im Gewebsverband	47
3.2.3	Primär isolierte Zellen	48
3.2.3.1	Adulte Kardiomyozyten und kardiale FLC (fibrocyte like cells)	48
3.2.3.2	Isolation neonataler Ratten Myozyten (NBR-Myozyten)	50
3.2.4	Thrombozyten	51
3.2.5	20S-Proteasom	51
3.2.6	Koronarinterventionelle Stents	52
3.2.6.1	Reinigung der Stenoberfläche	52
3.2.6.2	Dilatation der Stents	52
3.2.6.3	Zellpräparation auf Stentoberflächen	52
3.2.6.4	AFM-Abbildung der Stentoberflächen	53
3.2.6.5	Bildverarbeitung	53
3.2.6.6	Rauhigkeitsanalyse der Stentoberflächen	53
3.2.6.6.1	Berechnete Rauhigkeitsparameter	54
4	Ergebnisse	56
4.1	Immortale, bovine aortale Endothelzellen (BAEC)	57
4.1.1	Avitale Zellen	57
4.1.1.1	Exsikierte Zellen, Abbildung unter Raumbedingungen	57
4.1.1.2	Exsikierte Zellen, Abbildung unter zellphysiologischen Bedingungen bei 37°C	59
4.1.2	Vitale Zellen	64
4.1.2.1	biophysikalische Elastizitätsmessungen	67
4.2	Aortale Endothelzellen im Gewebsverband	69
4.3	Fibrozytenähnliche Zellen (FLC)	73
4.4	Kardiomyozyten / Kardiomyoblasten	78
4.4.1	Primärisolierte adulte, humane Kardiomyozyten	78
4.4.2	Zellkulturkardiomyozyten der H9C2-Zelllinie	82
4.4.3	Primärisolierte Kardiomyozyten neonataler Ratten	83
4.5	Thrombozyten	85
4.6	Abbildung komplexer, oligomerer Proteine - Das 20S-Proteasom	89
4.7	Koronarinterventionelle Stents	93
5	Diskussion	99
6	Ausblick	105
7	Zusammenfassung	106
8	Liste häufig verwendeter Akronyme	108
9	Literatur	109

# 1 Einleitung



Abbildung 1 aus <sup>1</sup>

„...meine Arbeit, die ich seit langer Zeit verrichtet habe, war niemals bestrebt, das Lob zu gewinnen, an welchem ich mich nun erfreue, sondern hauptsächlich von einer Sehnsucht nach Wissen angetrieben, welche mir, wie ich feststelle, mehr innewohnt als den meisten anderen Menschen. Überdies habe ich, wann immer ich etwas bemerkenswertes herausfand, es als meine Pflicht angesehen, meine Entdeckungen auf Papier niederzuschreiben, so dass alle geistreichen Menschen darüber informiert sein mögen...“(Antony van Leeuwenhoek (1632-1723; 12. Juni 1716)

Obgleich die mehr als 500 von Leeuwenhoek entwickelten „Mikroskope“ hinsichtlich ihres Grundaufbaus einfachen, handgeschliffenen, aber dennoch leistungsstarken Vergrößerungsgläsern entsprachen, die mit den heutzutage bekannten Compound-Lichtmikroskopen, wie sie in einfachster Form Mitte des 17. Jahrhunderts von Robert Hooke (1635-1703) in England, Jan Swammerdam (1637-1680) in den Niederlanden und Marcello Malpighi (1628-1694) in Italien benutzt wurden, nicht mehr vergleichbar sind, enthüllte der „Erfinder der Mikroskopie“, wie Leeuwenhoek häufig zu Unrecht genannt wird, einige Naturgeheimnisse, die als bedeutende Entdeckungen in die Geschichte der Biologie eingehen sollten: Algen (z.B. Spirogyra), Wimperntierchen (z.B. Vorticella), erste Beobachtungen von lebenden Bakterien der Mundflora verschiedener Probanden, freilebende und parasitäre Einzeller, Spermien, Blutzellen, Nematoden, Geißeltierchen, um nur einige zu nennen. 1698 bereits demonstrierte er dem bekanntermaßen, wissenschaftlich interessierten, russischen Zaren Peter die Zirkulation in den Kapillargefäßen eines Aals.<sup>1</sup> Hans Janssen, dessen Sohn Zacharias und Cornelius Drebbel gelten nach einvernehmlicher Annahme der Historiker als eigentliche Konstrukteure des ersten Mikroskops. Es wurde um 1595, also knapp vierzig Jahre vor Leeuwenhoeks Geburt entwickelt und bestand aus einem bikonkaven Okular und einer bikonvexen Objektivlinse.<sup>2</sup> Dennoch - sich die biologischen Pionierleistungen Leeuwenhoeks, Malphigis, Hookes und Swammerdams im Kontext der wissenschaftlichen und philosophischen Verhältnisse ihrer Zeit vergegenwärtigend, begreift man ihre Beschreibungen und Zeichnungen als Grundsteine für die Entwicklung der modernen Biologie. Mit der Weiterentwicklung der mikroskopischen Techniken und der optischen Geräte waren im Laufe der Jahrhunderte stets revolutionäre biologische Entdeckungen assoziiert und auch heute ist unser Wissenszuwachs über den Aufbau von geweblichen und zellulären Feinstrukturen eng mit der Entwicklung leistungsfähiger mikroskopischer Instrumente verbunden.

## 1.1 Meilensteine der Entwicklung der optischen Theorie und Lichtmikroskopie <sup>modif. nach 3</sup>

Das ersterwähnte und hinsichtlich seiner geschichtlichen Bedeutung kontrovers diskutierte, optische Instrument ist die berühmte, in Nimrod von Lanyard entdeckte

und nach ihm benannte „Lanyard Linse“, deren Entstehung auf den Zeitraum zwischen 721 - 705 v.u.Z. datiert wird. Obgleich die Historiker lange Zeit daran glaubten, dass sie das erste Beispiel einer plankonvexen Linse sei, sprechen Indizien neuerer historischer Untersuchungen gegen diese Vermutung. Gegenwärtig herrscht einvernehmliches Urteil darüber, dass dieser bearbeitete Stein eigentlich ein Teil eines Ornaments zu sein scheint und demzufolge davon ausgegangen wird, dass optische Linsen noch nicht so lange, wie ursprünglich vermutet, hergestellt und benutzt werden. Dennoch gibt es einige Hinweise auf die Existenz optischer Hilfsmittel vor Christi Geburt. Claudius Ptolemy beschrieb im 2. Jahrhundert v.u.Z., dass ein Holzstab im Wasser gekrümmt erscheint, bestimmte die Brechungswinkel dieses Phänomens mit faszinierend geringer Abweichung von  $0,5^\circ$  und berechnete daraus sehr genau die Brechungskonstante des Wassers. Im 1. Jahrhundert u.Z. war es Seneca, der den Vergrößerungseffekt des Wassers wie folgt beschrieb: „Briefe, klein und undeutlich, werden vergrößert und deutlicher durch eine mit Wasser gefüllte Glaskugel lesbar.“ Bereits im 10. Jahrhundert verfasste der Araber Scholar Alhazen (962-1038) die erste bedeutende Arbeit „Optische Sammlungen“, die nicht nur optische Prinzipien und Phänomene, sondern insbesondere die Anatomie des Auges und den Strahlengang bis zur Retina beschrieb. Im Jahr 1267 definierte Bacon detailliert, wie eine Linse beschaffen sein sollte, um damit Objekte zu vergrößern. Das gesammelte Wissen all dieser Veröffentlichungen allerdings blieb bis zu diesem Zeitpunkt einigen interessierten Wissenschaftlern und Philosophen vorbehalten. Das Interesse der Allgemeinheit an optischen Phänomenen blieb quasi bis zur Erfindung der Brille ungeweckt. Bekanntlich wurden Brillen in China schon deutlich früher als in der westlichen Welt verwandt. Nachweislich jedoch hatten diese planare, häufig gefärbte Gläser und dienten demnach vordergründig kosmetischen Kautelen und wohl kaum der Korrektur von Fehlsichtigkeiten. Obgleich moderne Brillen, wie wir sie heute in abgewandelter Form und Funktionalität kennen erst um 1280 in Florenz erfunden wurden, existiert eine sehr frühe Beschreibung über den speziellen Gebrauch einer Sehlinse. Pliny der Ältere (23 – 79 u.Z.) dokumentierte folgendes: „...Smaragde sind gewöhnlich konkav, so dass sie die sichtbaren Lichtstrahlen bündeln können. ...Imperator Nero nutzte einen Smaragd, um die Gladiatorenkämpfe zu verfolgen...“

Bezüglich der Erfindung der ersten Compound-Lichtmikroskope (Mikroskope mit mindestens 2 Linsen) existieren in der historischen Literatur mehrere, zum Teil kontroverse Angaben. Einige Autoren meinen, Galileo Galilei hätte kurz nach der Erfindung des Teleskops auch das erste Mikroskop erfunden. Urkundlich nachweisbar ist jedoch, dass Galilei das erste Teleskop nicht vor 1607 konstruierte. Demzufolge wird der Holländer Zacharias Jansen, der 1595 in Middleburg, wahrscheinlich in Zusammenarbeit mit seinem Vater die ersten Mikroskope entwickelte, als eigentlicher Pionier der Lichtmikroskopie anerkannt. Seine puristischen Instrumente bestanden aus drei, ineinander verschiebbaren Röhren und zwei integrierten Linsen, mit denen man bei optimaler Objektbeleuchtung neunfache Objektvergrößerung erzielen konnte. In der Folgezeit des 17. Jahrhunderts entstanden viele technische Modifikationen des Jansen-Mikroskops. Insbesondere die mikroskopierenden Wissenschaftler, wie Galilei, Malphigi, Harvey und natürlich der erwähnte Leeuwenhoek trieben diese Entwicklung voran. Bei allem wissenschaftlichen Patriotismus darf nicht vergessen werden, dass Mikroskope während des gesamten 17. Jahrhunderts und der Viktorianischen Zeit vorwiegend vom Adel als Spielzeug und zu Zwecken des Amüsements „missbraucht“ wurden. Robert Hooke erkannte bald, dass weitere Vergrößerungsleistung der Mikroskope

nicht allein durch Verlängerung des Augen-Objekt-Abstandes auf der mikroskopischen Achse zu erzielen ist und führte das 3-Linsen-System ein, welches bis heute als Standardkonfiguration gängiger Lichtmikroskope Verwendung findet. Natürlich bestehen Augen-, Feld- und Objektlinse heutzutage aus geschlossenen Linsenkombinationen und nicht mehr aus Einzellinsen.

Die beiden ersten bedeutenden Publikationen der angewandten Mikroskopie stammen aus den Jahren 1660 und 1665. Marcello Malpighi unterstrich die von William Harvey in seiner, 21 Jahre zuvor veröffentlichten Publikation „De motu cordis et sanguinis in animalibus“ aufgestellte Theorie der Blutzirkulation, indem er die Kapillarstrombahn als Verbindung zwischen Venen und Arterien entdeckte und damit den experimentellen und logischen Beweis erbrachte, dass die über Jahrhunderte dogmatisch propagierte Galensche Theorie über den Blutkreislauf falsch war. 1665 wurde Robert Hookes Buch „Micrographia“ veröffentlicht. Aus heutiger Sicht ist die Bedeutung dieser Arbeiten nur zu erahnen. Zu diesem Zeitpunkt war es völlig unklar, ob die Mikroskopie als Hilfsmittel der biologischen Forschungen jemals imstande sein wird, wissenschaftliche Neuentdeckungen zu ermöglichen. Es wurde zwar als außerordentlich interessant anerkannt, die winzigen Beine eines Flohs oder verschiedene Insektenteile vergrößert betrachten zu können, aber es konnte nach dem Wissenschaftsverständnis dieser Zeit nicht anerkannt werden, dass durch die vergrößerte Betrachtungsweise biologische Objekte in der Tat völlig anders imponieren, als aus der Entfernung betrachtet. Das limitierte Vermögen dieser Mikroskope ließ die Vordenker dieser Zeit nicht einmal ansatzweise abschätzen, dass Strukturen existieren, die im Rahmen der physikalischen Möglichkeiten lichtmikroskopisch durchaus problemlos darstellbar sind und den Grundbaustein aller lebenden Gewebe darstellen – Zellen. Robert Hooke, der dünne Korkschnitte betrachtete, erkannte, dass die physikalischen Eigenschaften des Korks mittels des mikroskopischen Abbildes sehr gut erklärt werden konnten. Er beschrieb ein Netzwerk von Stützgewebe, welches kleine Lufträume umschloss. Hooke nannte diese Lufträume „Zellen“, weil sie ihn an kleine Mönchszimmer erinnerten. Natürlich ahnte er nicht, dass seine „Zellen“ im Kork nur die verbliebenen Residuen dessen sind, was spätere Biologengenerationen als Zellen definieren werden.

Trotz unterschiedlicher Verbesserungen, welche die Stabilität und den Bedienkomfort der Mikroskope beeinflussten, stagnierte im 18. Jahrhundert die Entwicklung der mikroskopischen Wissenschaft. Es entstanden facettenreiche Mikroskoptyp-Variationen (Marshall-Mikroskop, Culpeper-Mikroskop, Martins Trommel-Mikroskop, Cuff-Mikroskop, Baker-Mikroskop u.a.), deren optischer Grundaufbau jedoch nicht wesentlich differierte. Mit den besten dieser Mikroskope war es nun schon möglich geworden 5-6  $\mu\text{m}$  große Strukturen abzubilden, wobei insbesondere im hohen Auflösungsbereich, bedingt durch chromatische und sphärische Abberationen der Linsen nur sehr unscharfe, unzureichend ausgeleuchtete und farbverzerrte Bilder generiert wurden. Die hinsichtlich des Auflösungsvermögens künftiger Mikroskopgenerationen innovativste Erfindung des 18. Jahrhunderts stellte deshalb die Entwicklung achromatischer Linsen dar. Der Rechtsanwalt Chester More Hall benutzte ein neuartiges, konkaves „Flint Glas“, kombinierte dieses mit den bis dato gebräuchlichen, konvexen „Crown-Gläsern“ und stellte fest, dass insbesondere die Farbunschärfen im Hintergrund verschwanden, ohne das dadurch das Auflösungsvermögen eingeschränkt wurde. Um seine Idee, im Interesse des großen, absehbar profitablen Geschäfts mit achromatischen Teleskopen und Mikroskopen geheim zu halten, beschäftigte er zwei unabhängige Linsenbauer. Unglücklicherweise kooperierten beide beauftragten Optiker mit dem Linsenbauer George Bass,

der Halls Geschäftsidee natürlich durchschaute. Das Patent dieser großartigen Entdeckung allerdings meldete 20 Jahre später ein Teleskopmacher namens John Dolland an, der durch Optikermeister George Bass von der achromatischen Linse erfuhr. Obgleich bekannt wurde, dass Dolland nicht der eigentliche Erfinder der achromatischen Linse war, behielt er die Patentrechte. Das Gericht entschied im Interesse des wissenschaftlichen Fortschritts und formulierte sinngemäß: „...eine geheime, nicht publizierte Erfindung nutzt der Welt nicht. Dolland war derjenige, der diese Entdeckung der Welt offenbarte und ihr somit zu Nutzen machte...“ Dennoch dauerte es bis ca. 1800, die ersten mikroskopischen Objektive mit achromatischen Linsen auszustatten und noch länger bis diese allgemein verfügbar und nutzbar wurden.

Nachdem das Problem der chromatischen Abberation gelöst zu sein schien, war es 1830 Joseph Jackson Lister, der Vater des berühmten Chirurgen und Entdecker der antiseptischen Methoden Joseph Lister, dem es gelang, durch viele, hintereinander in präzisiertem Abstand angeordnete Linsen geringer Brechkraft, sphärische Abberationen zu minimieren. Das neben den erwähnten Problemen ein zusätzlicher Faktor existierte, der das physikalische Auflösungsvermögen der Mikroskope beeinflussen könnte, sollte bis 1877 ein Geheimnis bleiben. Ernst Abbe publizierte in jenem Jahr eine Arbeit, welche durch folgende Formel die Winkelapertur und die Wellenlänge des Lichtes als auflösungslimitierende Faktoren beschrieb:

$$d = \frac{\lambda}{2n \sin \theta}$$

- wobei (d) den minimal auflösbaren Abstand zweier Punkte darstellt,  
 (λ) die Wellenlänge des Lichtes bezeichnet,  
 (θ) den Winkel des Lichtkegels, der zwischen einem Objektpunkt und dem Objektiv gebildet wird, beschreibt,  
 (n) als Brechungsindex des Objektivs definiert ist und  
 (2n sinθ) numerische Apertur genannt wird.

Der Einsatz unterschiedlicher Immersionsflüssigkeiten (Wasser, Öl) erlaubte es um 1880, die maximale Grenze des Auflösungsvermögens eines Lichtmikroskops von 0,2 μm zu erreichen. Abgesehen vom Einsatz des UV-Lichtes als Strahlungsquelle oder spezieller Immersionsflüssigkeiten stellt diese Grenze bis heute das erreichbare Limit der Lichtmikroskopie dar.<sup>3</sup>

## 1.2 Mikroskopischer Fortschritt im 20. Jahrhundert

Entsprechend dem Entwicklungsstand der Anfang des letzten Jahrhunderts verfügbaren Mikroskope war es möglich, alle Hauptbestandteile von Zellen, wie Zellkern, Chloroplasten, Vakuolen etc. abzubilden. Die detailliertere Aufklärung der Ultrastruktur zellulärer Kompartimente konnte trotz zahlreicher innovativer Verbesserungen der optischen Ausrüstung, leistungsstarker Präparatsbeleuchtung, der Einführung unterschiedlicher Kontrastverfahren (Hellfeld-, Dunkelfeld-, Phasenkontrast-, Reliefkontrast-, Interferenzkontrast-, Reflexionskontrastmikroskopie) und der Fluoreszenzmikroskopie erst Anfang der 30er Jahre durch den späteren Nobelpreisträger Ernst Ruska ermöglicht werden, der 350 Jahre nach der Anwendung der ersten Mikroskope die Elektronenmikroskopie entwickelte und der

mikroskopischen Technik damit völlig neue Dimensionen eröffnete. Aber auch die genannten Verfahren der lichtmikroskopischen Strukturanalyse wurden und werden, nicht zuletzt im Interesse der Verbesserung des Bedienungskomforts, ständig weiterentwickelt, so dass diese Methoden heute in den Bereichen der histologischen, zellulären und immunhistologischen Diagnostik und nicht zuletzt auf dem Gebiet der Zellkultur den Goldstandard darstellen. Elektronenmikroskopie versteht sich demnach nicht als kompetitive, sondern vielmehr als weiterführende, additive Methode zur morphologischen Aufklärung zellulärer Feinstruktur bis hin zur Struktur von Makromolekülen. Die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) ermöglicht laterale Auflösungen von 2-3 nm an biologischen Proben. Der Arbeitsbereich des TEM (2 nm bis ~ 100 µm) überlappt den des Lichtmikroskops (~0,3 µm), so dass zellarchitektonische Zusammenhänge quasi nur durch die Applikation beider Methoden aufgeklärt werden können.<sup>4</sup> Sowohl TEM als auch SEM (engl.: scanning electron microscopy) erfordern ausgefeilte Präparationstechniken an den, für die histologische Untersuchung bestimmten Objekten, welche die komplexen intra- oder supravitalen Stoffwechselprozesse der Strukturen nach Art einer Momentaufnahme fixieren und damit einerseits postmortale Zerfallerscheinungen verhindern und andererseits die Abbildung der Objekte im erforderlichen Hochvakuum bei intensiver Elektronenbestrahlung ermöglichen.<sup>5</sup> In Kenntnis der dynamischen und funktionell orientierten Struktur biologischer Objekte wurden Präparationstechniken für die Elektronenmikroskopie dahingehend weiterentwickelt, definierte Funktionszustände fixieren zu können. Diese Techniken eröffneten die Möglichkeit, neben strukturellen, insbesondere strukturassoziierte funktionelle Zusammenhänge hochauflösend zu erforschen. Die SEM generiert an Objekten mit ausgeprägter Oberflächen-Topografie noch brillantere Abbildungen mit hervorragender Tiefenschärfe und Pseudo-Dreidimensionalität bei hoher lateraler Auflösung. Außerdem können mittels eines Mikroanalysezusatzes qualitative und quantitative Bestimmungen der lokalen Probenzusammensetzung durchgeführt werden.<sup>6</sup> Besonders vielversprechend scheinen neuere, rasterelektronenmikroskopische Verfahren, wie LVSEM (engl.: low voltage scanning electron microscopy) und ESEM (engl.: environmental scanning electron microscopy) zu sein, mit denen die direkte Abbildung getrockneter bzw. sogar wasserhaltiger, aber dennoch avitaler biologischer Proben mit deutlich höherer Auflösung und Tiefenschärfe als in der Lichtmikroskopie gelingt.<sup>7</sup>

Lipide, Proteine und alle anderen Strukturen, die mit einem Fixans reagieren, sind naturgemäß fixationslabil; es wird daher keine Fixierungstechnik das Gewebe in dem Zustand erhalten, in welchem es sich während des Lebens befindet. Man muss sich bewusst sein, nur ein Fixationsbild zu untersuchen, ein Kunstprodukt oder Artefakt, das jedoch durch seine Reproduzierbarkeit die zuverlässige Beurteilung der (niemals gesehenen) tatsächlichen Situation erlaubt. Dieses, durch die Fixierung und histologische Technik wiederholbare, erfahrungsmäßig gekennzeichnete Bild wird nach F. Nissl Äquivalentbild (des natürlichen Zustandes) genannt.<sup>5</sup> Auch aufgrund dieser Tatsache waren die Bemühungen der mikroskopierenden Biowissenschaftler darauf ausgerichtet, mikroskopische Instrumente dahingehend zu modifizieren, dass möglichst alle Auflösungsvorteile der Elektronenmikroskopie, deren 3-Dimensionalität und hohe Tiefenschärfe unter zellphysiologischen Verhältnissen und ohne Zerstörung des Gewebes realisiert werden können. Als 1957 in einem US-Patent erstmals die wichtigsten Vorteile der konfokalen Mikroskopie beschrieben wurden, sollte dies - aufgrund unzureichender, vordergründig beleuchtungslimitierter Bildqualität - keine besondere Aufmerksamkeit erregen. Erst 10 Jahre später gelangen Egger und Petran die ersten „optischen Schnitte“(s.u.). Nach intensiver

Weiterentwicklung dieser Technologie durch Sheppard und Wison in Oxford gelang Brakenhof und seinen Mitarbeitern 1978 in Amsterdam die erste überzeugende Demonstration der Abbildungsmöglichkeiten konfokaler Mikroskopie. Das dem konfokalen Mikroskop zugrundeliegende Prinzip des „optischen Schneidens“ wurde eigentlich erst 1985 von Wijnaendts van Resandt et al. an fluoreszierenden Objekten demonstriert. Im konfokalen Strahlengang werden alle außerhalb vom Fokus liegenden Strukturen unterdrückt. Dies wird erreicht, indem mittels einer Punktlichtquelle (Laser), eines Punktlichtdetektors und verschiedener Detektionslochblenden nicht das gesamte Bild, sondern jeweils nur ein Punkt des Objektes abgebildet und Licht von außerhalb der Brennebene vollständig unterdrückt wird. Dadurch wurde es möglich, dicht gepackte Strukturen und dickere Gewebe in beliebigen optischen Fokusebenen „zu zerschneiden“ (optisches Schneiden) und somit reale, 3-dimensionale Datensätze zu generieren. Durch kontinuierliches Bewegen des Objektes entlang der optischen Achse werden zunächst 2-dimensionale Schnitte unterschiedlicher Fokusebenen aufgenommen (z.B. x-y-Schnitte), die weniger als 500 nm voneinander entfernt sind. Die computergestützte Kombination dieser 2-dimensionalen Bildstapel ermöglicht dann die reale 3-dimensionale Rekonstruktion. Die so erreichte Tiefenschärfe übersteigt die lichtmikroskopisch erreichte um ein Vielfaches, da die Maximierung dieser, im Lichtmikroskop nur durch die Reduktion der Apertur und damit der Auflösung zu erreichen ist. Erwähnenswert ist, dass die axiale Auflösung dieser Methode (~400 - 500 nm) deutlich geringer als die laterale ist.

Die Halbwertsbreite ist der Durchmesser eines Punktobjektes, an dem die Intensität

#### **Halbwertsbreite eines punktförmigen Objektes in Nanometern**

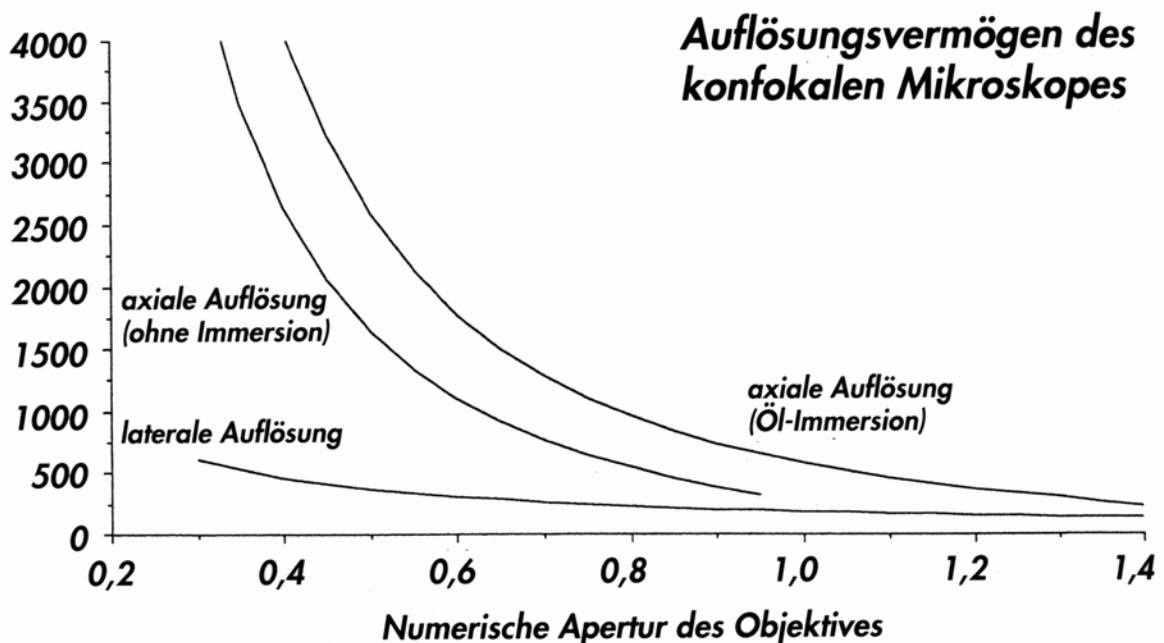


Abbildung 2 aus <sup>8</sup>

desselben auf die Hälfte abgefallen ist. Diese hängt natürlich, wie auch beim konventionellen Lichtmikroskop, von der Wellenlänge des verwendeten Lichtes und von der numerischen Apertur des Objektivs ab. Die Vereinigung der Eigenschaften konfokaler Mikroskopie mit geeigneten Fluoreszenzfarbstoffen ermöglicht die simultane Untersuchung von strukturellen und dynamischen Eigenschaften lebender

Zellen. So ermöglichte z.B. die Entwicklung  $\text{Ca}^{++}$ -empfindlicher Fluoreszenz-Farbstoffe, den Nachweis zu führen, dass die spontane  $\text{Ca}^{++}$ -Freisetzung des sarkoplasmatischen Retikulums unmittelbar mit der spontanen Kontraktionsaktivität vitaler Kardiomyozyten gekoppelt ist. Folgerichtig wurden in Kenntnis dieser physiologischen Situation die zellphysiologischen Auswirkungen, verschiedener pathophysiologischer Stimuli mit diesem Setup untersucht. Moderne Konfokalmikroskope mit gekoppelten Hochleistungs-Bildverarbeitungssystemen erfassen viele Parameter (Mehrfachfärbungen und Reflexionen in 3 Dimensionen, Transmissions- und andere Kontraste, Zeitachse bei in-vivo Experimenten u.v.a.) simultan und liefern so ein umfassenderes und genaueres Bild der untersuchten Probe als herkömmliche Lichtmikroskope und sind heutzutage unentbehrliche Werkzeuge der modernen, quantitativen Mikroskopie geworden, von denen - insbesondere hinsichtlich der Aufklärung funktionell-struktureller Assoziationen - noch einiges erwartet werden darf. (Absatz modifiziert nach <sup>8)</sup>)

Die primär als wissenschaftliches Kuriosum angesehene akustische Mikroskopie, die akusto-physikalische Phänomene als Ergebnis der Interaktion zwischen Ultraschallwellen und untersuchter Materie in optischer Form reproduziert, erlangt gegenwärtig trotz der Erkenntnis, dass mechanische Parameter durchaus zellphysiologische Relevanz besitzen, nur geringe Aufmerksamkeit in der biomedizinischen Grundlagenforschung und sei deshalb hier nur der Vollständigkeit halber erwähnt.

### 1.3 Entwicklung der „Atomic Force Microscopy“ – Geburtsstunde einer mikroskopischen Ära?

Dreidimensionale Proteinstrukturen und deren funktionelle Anatomie in lebenden Zellen begreifen und kennen wir trotz intensiver Grundlagenforschung der Biowissenschaftler in vielen Fällen noch nicht ausreichend. Uns gegenwärtig bekannte, strukturelle Modelle der Ionenkanäle sind größtenteils das Produkt intensiver, aufwendig computeranimierter Kalkulationen, die einerseits energetische Aspekte und andererseits zumeist elektronenmikroskopisch gewonnene, topologische Kriterien berücksichtigen. Trotz ihres puristischen Modellcharakters lassen sich mit ihrer Hilfe Konformationsänderungen der Molekülstruktur und damit assoziierte funktionelle Veränderungen zumindest ansatzweise vorhersagen. Der bekannte Physiker Richard Feynman (1918 – 1988) unterstrich anlässlich des Jahrestreffens der „American Physical Society“ im Dezember 1959 in seiner berühmt gewordenen Vorlesung zum Thema „There’s Plenty of Room at the Bottom“, dass die Mikroskopie einzelner Moleküle der Schlüssel für die Probleme der modernen Molekularbiologie sei. Er fragte ins Auditorium: „...Was sind heute die zentralen und fundamentalen Fragen der Biologie? – Es sind Fragen, wie die folgenden: Wie ist die Sequenz der DNA-Basen? ...Wie sind die Mikrosomen organisiert? Wie werden Proteine synthetisiert? Wie funktioniert die RNA? Wo ist sie lokalisiert? Wie wird im Rahmen der Photosynthese Licht in chemische Energie verwandelt?...“ Darauf antwortend formulierte er: „...Es ist sehr einfach viele dieser fundamentalen biologischen Fragen zu beantworten, wenn sie die Dinge nur genau betrachten! Sie werden die Reihenfolge der Basen in der DNA-Kette verstehen und sie werden die Strukturen der Mikrosomen erkennen. ...Unglücklicherweise sehen die gegenwärtigen Mikroskope nur auf einem Niveau, das noch ein wenig zu roh ist. ...Macht die Mikroskope hundertmal leistungsfähiger und viele Probleme der Biologie



werden wesentlich einfacher sein...“<sup>9</sup> Wie bereits erwähnt, sind einzelne Moleküle mittels lichtoptischer Mikroskope theoretisch nicht darstellbar. Obgleich in der Elektronenmikroskopie diese physikalische Begrenzung nicht existiert, so ist es bekanntlich nicht möglich vitale, unfixierte Gewebe und Strukturen mit dieser Methode zu untersuchen.

Als 1981 Gerd Binnig und Heinrich Rohrer das „Scanning Tunneling Microscope“ (STM) bei IBM in Zürich entwickelten<sup>10</sup> und damit erstmalig lokal hochaufgelöste Objekteigenschaften im Nahfeld inerter Oberflächen erfassten<sup>11</sup>, konnte niemand erahnen, dass dies die Geburtsstunde einer neuen mikroskopischen Ära, insbesondere auf dem Gebiet der biomedizinischen Grundlagenforschung war und die 1959 utopisch erscheinende Vision Feynmans in absehbarer Zeit Realität werden sollte. 1982 konnten erstmalig real dreidimensionale Abbildungen von Festkörper-Oberflächen mit atomarer Auflösung generiert werden. Der theoretische Hintergrund der Funktionsweise des STM, auf den ich später noch detaillierter eingehen werde, bedingt jedoch, dass dieser bedeutsame Fortschritt in der mikroskopischen Technik zunächst nur an elektrisch leitenden Oberflächen realisiert werden konnte. In heutiger Kenntnis dessen, was im letzten Jahrzehnt mit Hilfe dieser Methode auf dem Gebiet mikroskopischer Grundlagenforschung erreicht wurde, erscheint es umso gerechtfertigter, dass Binnig und Rohrer für ihre wissenschaftliche Leistung 1986 der Nobelpreis für Physik verliehen wurde.

Nach der Einführung der Methode beschränkte sich deren Anwendung zunächst auf die Untersuchung und Weiterentwicklung konduktiver, kristalliner Strukturen mit dem Hintergrund, moderne mikroelektronische Halbleiterelemente zu entwickeln. Außerdem waren Gold-, Diamant- und Graphitoberflächen als konduktive Materialien gängige Untersuchungsmedien. Da biologische Proben zumeist nichtleitende bzw. nur schwach semikonduktive Eigenschaften besitzen, waren diese der STM zunächst nur indirekt zugänglich. Ein Weg, die isolierenden Eigenschaften von biologischen Proben zu überwinden, bestand darin, die zu untersuchenden Objekte zunächst einer raschen Gefriertrocknung im Hochvakuum zu unterziehen und im Anschluss, deren Oberflächen mit einer metallischen Schicht (Gold, Platin-Iridium-Kohlemischfilm u.a.) zu „besputtern“ (engl.: sputter – besprühen). Diese, aus der Transmissions-Elektronenmikroskopie übernommene Methode wurde beispielsweise zur Präparation boviner Katalase und recA-DNA-Komplexe angewendet. Besonders vielversprechend waren erste Abbildungen synthetischer Biomembranen, sogenannter Langmuir-Blodgett-Filme.<sup>12,13</sup> Auf der Grundlage der STM-Technologie wurde 1986 von Binnig, Quate und Gerber das erste, im angloamerikanischen Sprachraum als „Atomic Force Microscope“ bezeichnete Rasterkraftmikroskop geschaffen<sup>14</sup>, mit dem nun auch Oberflächen von Non-Konduktoren im atomaren Auflösungsbereich untersucht werden konnten. Eine der ersten Arbeiten, die molekulare Auflösung an einem synthetisch polymerisierten, organischen AE-TDA-(n-[2-Aminoethyl]-10,12-Tricosadiamid) Monolayer wurde im Januar 1988 in Science publiziert.<sup>15</sup> Der Autor dieser Veröffentlichung demonstrierte noch im selben Jahr topografische Auflösung im Bereich von 1 nm bis 0,5 nm an Purpurmbranen, einem bakteriellen Photosyntheseorganell.<sup>16</sup> Diese Purpurmbranen wurden von vielen Arbeitsgruppen untersucht. Die AFM-Abbildung dieser Strukturen unter physiologischen Bedingungen jedoch gelang im Hochauflösungsbereich (<1 nm) erstmals 1995.<sup>17</sup> Gould et al. gelang diese Auflösung an Oberflächen von DL-Leucin-Kristallen.<sup>18</sup> 1991 beschrieb Singh synthetische DPPC- (Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin) und DPPE-Membranen (Dipalmitoyl-Phosphatidylethanolamin) rasterkraftmikroskopisch und postulierte, dass diese Membranen als natürliche

Ankerstrukturen genutzt werden können, um daran präparierte Membranproteine für die AFM-Abbildung kovalent zu binden und diese dadurch zu immobilisieren.<sup>19</sup> Die erwähnten Purpurmembranen, die aus dem *Halobacterium halobium* präpariert wurden, bildeten bereits zwei Jahre später das Substrat für die AFM-Abbildung einzelner Bakteriorhodopsin-Moleküle unter quasi physiologischen Bedingungen (physiologische Pufferlösung, allerdings Raumtemperatur).<sup>20</sup> Die Einführung eines laseroptisch kontrollierten Federhebels („Cantilever“) zur Detektion der interatomaren Wechselwirkung zwischen Probenspitze und Objektoberfläche ermöglichte einen verbesserten Bedienkomfort und höhere, theoretisch erzielbare Auflösungen.<sup>21</sup> Nachdem gezielte physikalische Analysen der, die Abbildung generierenden Wechselwirkungskräfte durchgeführt wurden, erkannte man, dass insbesondere, die unter Raumbedingungen durch Luftfeuchtheitsfilme an der Objektoberfläche auftretenden, adhäsiven Einflüsse („Meniskuskräfte“) den interatomaren Kräften um Größenordnungen überwiegen, so dass einerseits die applizierten Kräfte mutmaßlich destruierenden Einfluss auf biologische Proben haben könnten und andererseits das Messsignal eben nicht nur die, dem Messprinzip zugrunde liegenden interatomaren Kräfte beschreibt. Weisenhorn und Hansma, die eindeutig zu den Protagonisten der Rasterkraftmikroskopie zu zählen sind, beschrieben 1989 unter Zuhilfenahme sogenannter Kraft-Abstands-Kurven und einer einfachen, aber hervorragend handhabbaren Flüssigkeitszelle sehr genau, dass die geringste zu erreichende Abbildungskraft im Bereich von 0,1 nN liegt, wogegen die unter Raumbedingungen auftretenden Kräfte zwischen Probenspitze und zu untersuchendem Objekt um zwei Zehnerpotenzen größer sind und im Bereich von 100 nN liegen.<sup>22</sup> Diese Arbeit und die von Butt 1991 veröffentlichte Arbeit über den Einfluss von elektrostatischen, van der Waals und Wasserstoffbrückenbindungskräften auf die rasterkraftmikroskopische Abbildung in Elektrolytlösungen<sup>23</sup> bildeten aus meiner Sicht die Grundlage für weitere Untersuchungen in zellphysiologischer Umgebung. Außerdem erleichterte sie die Interpretation von Abbildungen biologischer Objektoberflächen, die unter Raumbedingungen aufgenommen wurden. Im Kontext dieser grundlegenden Arbeiten war es kaum anders zu erwarten, dass auch die ersten dreidimensionalen AFM-Bilder nativer, nucleosomaler DNA und kovalent biotungebundener, PCR-amplifizierter DNA-Fragmente von der Arbeitsgruppe um Hansma geliefert wurden.<sup>24,25,26</sup> So waren es auch Physiker dieser Gruppe, denen 1989 die aus kardiologischer Sicht außerordentlich interessante Echtzeitdarstellung des Aggregationsprozesses von Fibrinogen nach Zugabe des Gerinnungsenzyms Thrombin in Pufferlösung gelang.<sup>27</sup> Genauere strukturelle Analysen von Fibrinogen lieferte Wigren 1991.<sup>28</sup> Damit wurde eine weitere Tür zu neuen Möglichkeiten des AFM aufgestoßen – die Echtzeitabbildung funktioneller biologischer oder zellphysiologischer und chemischer Prozesse bei molekularer Auflösung. 1990 nutzte Weisenhorn diese neue Möglichkeit, um Antigen-Antikörper-Reaktionen zu visualisieren.<sup>29</sup> Ein synthetisiertes Proteolipid (Fab-Lipid), bestehend aus einem fab-Fragment eines monoklonalen anti-DNP-Antikörpers und einem Phospholipid (Spacerlipid) wurde chemisch an eine lateral polymerisierte, quarzassoziierte Lipidmembran gebunden und so die, für die AFM-Abbildung unerlässliche Immobilisation des Antigen-Antikörper-Komplexes erreicht.<sup>30</sup> Außerdem beschrieb Weissenhorn in der genannten Arbeit Abbildungen des frisch aufgereinigten und an Mica (s.u.) gebundenen Myoproteins Aktin und konnte zeigen, dass die Anordnung der Aktinketten einerseits durch Ladungsverteilung innerhalb der Mica-Oberfläche, andererseits durch die abbildungsbedingt auf die Aktinoberfläche applizierten Kräfte beeinflusst und alteriert wird. Schlussfolgernd postulierte er, dass bessere,

realitätsnähere, physiologische Abbilder biologischer Objekte eng mit der weiteren Entwicklung der Cantilever-Technologie, der Probenpräparation und der Minimierung der interagierenden Abbildungskräfte durch zu entwickelnde Abbildungsmodi in Verbindung stehen werden. Helen G. Hansma gelang 1991 die AFM-Darstellung einzelner IgM-Moleküle in Ethanol, die durch Cryopräzipitation aus dem Serum eines Patienten mit Morbus Waldenström gewonnen wurden.<sup>31</sup> Die spezifische Bindung und daraus resultierende Immobilisierung von IgG-Molekülen an einer Metalloberfläche wurde 1993 von Ill beschrieben. Um die orientierte Bindung des Fc-Anteils des Immunglobulins an die Metalloberfläche zu erreichen, wurde ein metallbindendes Peptid (His-Trp-His-His-His-Pro) gentechnisch an das karboxyterminale Ende der schweren Immunglobulinkette synthetisiert. Dieser nicht denaturierende Immobilisierungsvorgang beeinträchtigt die Funktionalität des IgG-Moleküls nicht. Das antigenbindende Fragment des Immunglobulins (NH<sub>2</sub>-Terminus) wird dadurch in eine stabile Position gebracht, welche die Echtzeituntersuchungen der Antigen-Antikörper-Interaktion möglich macht.<sup>32</sup>

Eine weitere Applikation der Rasterkraftmikroskopie wurde im Dezember 1990 beschrieben. Edstrom et al. gelang es, enzymatische Prozesse und die damit assoziierten Konformationsänderungen der beteiligten Proteine am Beispiel des Phosphorylase b-Phosphorylasekinase-Komplexes vergleichend mit dem STM und dem AFM zu untersuchen. Die dabei gewonnenen strukturellen Daten zeigten einen erstaunlich hohen Homologiegrad verglichen mit elektronenmikroskopisch und röntgenkristallografisch erhobenen Befunden.<sup>33</sup> HPI-(hexagonally packed intermediate) Layer, ein natürliches Proteingitter aus der Zellwand des Bakteriums *Deinococcus radiodurans* untersuchte man nach kovalenter Immobilisation der Struktur in Pufferlösung mittels Contact-Mode-AFM. Die dabei akquirierten Abbilder zeigen erstaunliche Auflösung bei exzellentem Signal-Rausch-Verhältnis.<sup>34</sup> Zu den elektronenmikroskopisch und röntgenkristallografisch am besten untersuchten biologischen Proben gehören sogenannte Bakterienporine. Das *E.coli*-OmpF-Porin und das *Bordetella pertussis*-Porin wurden in kristalliner Form in synthetische Bilayer implementiert und mittels AFM-Technologie abgebildet. Auch hierbei zeigte sich eine erstaunliche Übereinstimmung der gewonnenen Daten mit den bereits bekannten Daten aus den genannten Referenzuntersuchungen. Die Besonderheit der rasterkraftmikroskopischen Untersuchung dieser Strukturen aber lag insbesondere darin, dass bei Abbildung des *B. pertussis*-Porins in Puffermedium die typische trimere Untereinheitenstruktur verschwand und jedes einzelne Monomer perlenartige Strukturen aufwies, die aus elektronenmikroskopischen Analysen nicht bekannt waren.<sup>35</sup> Diese Erkenntnis unterstreicht die Vermutung, dass funktionsinduzierte bzw. funktionsassoziierte Konformationsänderungen von Membranproteinen nur unter physiologischen Bedingungen verwertbar untersucht werden können. 1994 beschrieb Schabert Herangehensweisen, um das native, non-kristalline *E.coli*-Porin reproduzierbar, strukturell zu analysieren. Dabei diskutierte er die nachweisbare trimere Morphologie des Komplexes, den er sowohl von der extrazellulären, als auch von der periplasmatischen Seite abbildete, kritisch hinsichtlich typischer AFM-Artefakte, wie z.B. der Tipgeometrie.<sup>36</sup> Neben den genannten Bakterienporinen gelang 1993 die dreidimensionale Abbildung des Cholera-toxins unter physiologischen Bedingungen.<sup>37</sup> 1993 untersuchte ebenfalls Lal auf der Zellmembran von Oozyten exprimierte nicotinerge Acetylcholin-Rezeptoren (AChR) im luftgetrockneten Zustand mittels AFM. Dazu wurde AChR-RNA der Ratte in-vitro aus klonierten cDNAs synthetisiert und in *Xenopus laevis* Oozyten injiziert.<sup>38</sup> Auch mitochondriale Benzodiazepin-Rezeptoren der Leydig'schen Zellen wurden

vergleichend mittels TEM und AFM untersucht. Die morphometrischen Resultate dieser Arbeit zeigen, dass der mitochondriale PBR (peripheral-type benzodiazepine receptor) eine porenförmige Struktur in der Kontaktzone zwischen innerer und äußerer Mitochondrienmembran ist, der Moleküle mit bestimmtem Molekulargewicht ( $MW < 6000$ ) wie beispielsweise Cholesterol zur inneren Mitochondrienmembran transportiert, wo dieses durch Cytochrome P 450 metabolisiert werden kann.<sup>39</sup> Die AFM-gestützte Lokalisation einzelner Kalziumkanäle an der präsynaptischen Membran einer Nervenendigung des Ziliarganglions von Hühnern konnte durch Markierung der Kanäle mit Goldpartikeln (via  $\omega$ -Conotoxin, einem irreversiblen  $Ca^{++}$ -Kanalblocker an diesen Synapsen) eindrucksvoll demonstriert werden.<sup>40</sup> Wie gezeigt, wurden bis dato aufgrund der AFM-Auflösungskapazität im Nano- und Subnanometerbereich hauptsächlich einzelne, aufwendig präparierte und immobilisierte Moleküle und deren Interaktionen zum Forschungsgegenstand der Rasterkraftmikroskopie erhoben. Eine der ersten Arbeiten, die Vorteile aber auch die wesentlichen Limitationen der neuen Methode bei der Untersuchung ganzer Zellen und Zellverbände beschreibt, erschien im Oktober 1990: Neben der Darstellung des salzliebenden Archebakterium *H. Halobium* im getrockneten Zustand und lebender Pflanzenzellen (z.B. Zellen der Blattunterseite von *Lagerstroemia subcostata*, einem kleinen indischen Baum) wurden Erythrozyten und Leukozyten in physiologischer Pufferlösung untersucht. Dabei konnten an lebenden Zellen Strukturen von ca. 10 nm Größe dreidimensional sichtbar gemacht werden.<sup>41</sup> Henderson zeigte die zelldynamischen Veränderungen der Aktin-Filamente lebender neuronaler Gliazellen. Dabei konnte er an den aus retinalem Neuroepithel der Spezies *Xenopus laevis* isolierten Zellen nach Kontakt mit dem Substrat (mit rat-tail-Kollagen beschichtetes Glas) typische Stigmata migrierender, neuronaler Zellen nachweisen. Die vom Zellrand her auswachsenden Lamellopodien und Filopodien und deren zytoskelettale Struktur wurden in beeindruckender Weise demonstriert und außerdem dynamische Wechsel der Morphologie dieser Zytoskelettstrukturen während mehrerer Abbildungsprozeduren (Scans) als zelluläre Vitalitätszeichen gewertet. Trotz dieses kombinierten, morphologisch und funktionell orientierten Versuchsansatzes konnten damit jedoch Vorgänge der zellulären Signaltransduktion beim Kontakt mit anderen biologischen Oberflächen nicht weiter aufgeklärt werden.<sup>42</sup> Imposante dreidimensionale Bilder der 36-minütigen Migrationsdynamik hippokampaler Neuron- und Gliazellen der Ratte lieferte Hendersons Arbeitsgruppe bereits wenige Monate später.<sup>43</sup> Lamellopodien und endozytotische Prozesse migrierender MDCK- (Madin-Darby-Canine-Kidney) Endothelzellen in vivo wurden auch von Oberleithner untersucht.<sup>44,45</sup> Imponierende Daten bezüglich zelldynamischer Prozesse lieferten die 1992 publizierten Arbeiten von Haberle und Henderson. Erstgenanntem gelang es, die Rasterkraftmikroskopie zur Echtzeitdarstellung des viralen Infektionsprozesses lebender Zellen in-situ einzusetzen.<sup>46</sup> Langsame dynamische Prozesse und deren Abgrenzung von methodisch determinierten, morphologischen Veränderungen der Zelloberfläche konnte eindrucksvoll an vitalen MDCK gezeigt werden.<sup>47</sup> Die Darstellung der Bewegung submembranöser Zellstrukturen humaner Thrombozyten und der Ausbreitung der Zellmembran nach Aktivierung belegt die Fähigkeit der Rasterkraftmikroskopie zur Detektion langsamer zelldynamischer Prozesse nachdrücklich.<sup>48,49</sup> Auch die Kombination bereits bekannter, strukturanalytischer Verfahren mit der Rasterkraftmikroskopie eröffnete neue Möglichkeiten. Die gepulste Flash-Röntgenstrukturanalyse erlaubt durch spezielle Anordnung von Siliziumnitrid- und PMMA (Polymethylmethacrylat)-Membranen, die eine nur 1-2µm hohe Kammer mit atmosphärischen Umgebungsbedingungen von

einer Vakuumkammer trennen, die Abbildung lebender Zellen. Das auf diesem Weg erzeugte Relief in einem speziellen Röntgenwiderstand wurde mittels Rasterkraftmikroskopie untersucht und man gelangte durch diese Kombination zu genaueren strukturellen Erkenntnissen an lebenden Spermazellen.<sup>50</sup>

Den unübersehbaren Anwendungsmöglichkeiten der Rasterkraftmikroskope zur hochauflösenden Strukturaufklärung an Oberflächen unterschiedlichster Objekte schienen kaum Grenzen gesetzt. Bis zu diesem Zeitpunkt existieren rasterkraftmikroskopische Problemlösungen, die gleich mehrere Vorteile dieser neuen Methode vereinigen:

- hochauflösende Abbildung atomarer bzw. molekularer Strukturen im Nahfeld von Objektoberflächen,
- die an biologischen Objekten auch unter physiologischen Bedingungen möglich,
- und in der Lage ist, langsame dynamische Vorgänge am Untersuchungsobjekt zu detektieren.

Natürlich wird der Begriff Mikroskopie in erster Linie mit dem Begriff „Abbildung“ in Verbindung gebracht. Diesem Anspruch kann die Rasterkraftmikroskopie nicht nur wegen des hohen Auflösungsvermögens, sondern auch wegen des hohen Signal-Rausch-Verhältnisses ohne weiteres gerecht werden. Obgleich die kombinierte Darstellung struktureller und funktioneller Parameter wichtige zellphysiologische Erkenntnisse zu liefern vermag, sind Rasterkraftmikroskope doch mehr als „nur“ oberflächensensitive, hochauflösende Abbildungsinstrumente. Vielmehr werden sie seit 1991 zunehmend auch als hochsensible Messgeräte oberflächengebundener, biomechanischer Eigenschaften, wie Oberflächenelastizität- und Viskosität oder Oberflächenrauigkeit angewendet. Außerordentlich spannend und überdies auch von hohem wirtschaftlichen Interesse ist die modifizierte Anwendung der Rasterkraftmikroskopie auf dem Gebiet der Nanolithografie. Hiermit gelingt es, einzelne Atome willkürlich und gesteuert zu verschieben<sup>51</sup> oder Punkte in magneto-optischen Filmen viel dichter zu schreiben, als dies mit herkömmlichen Fernfeldmethoden gelingt.<sup>52</sup> Möglicherweise kann diese Methode zur Entwicklung von Speichermedien mit sehr hohen Speicherdichten beitragen. Natürlich liegt der Schluss nahe, dass derartige Manipulationen nicht an einzelnen Atomen, sondern auch an biologischen Strukturen möglich sein müssten. Jan Hoh diszezierte mit zunehmender, via Cantilever applizierter Kraft hepatische gap-junctions sowohl in unfixiertem, als auch in glutaraldehydfixiertem Zustand und konnte nach Fixation der extrazellulären Oberfläche das typisch hexagonale Muster interzellulärer, funktioneller Hemi-Kanalproteine, sogenannter Konnexine darstellen.<sup>53</sup> Ein Jahr später untersuchte Hoh die extrazelluläre Struktur dieser gap-junctions unter komplett zellphysiologischen Bedingungen.<sup>54</sup> Die hexagonale Anordnung der junctionalen Konnexine wurde an kardialen gap-junctions 1995 gezeigt.<sup>55</sup> Auch andere transmembranäre Kanalproteine, wie die Natrium-Kalium-ATPase in kristalliner Form oder die Kalzium-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums wurden 1992 von Apell, Paul, bzw. letztgenannte von Lacapere untersucht und mit den Ergebnissen elektronenmikroskopischer Analysen verglichen.<sup>56,57,58</sup> Im Gegensatz zu Apells Arbeit nutzte Paul et al. 1994 zur Darstellung der kristallinen ATPase einen neuen, an biologischen Proben weniger destruktiven Abbildungsmodus, den sog. Tapping-Mode (TMAFM). Dieser Modus, auch Intermittent-Contact-Mode genannt, vereinigt die Vorteile der bisher etablierten, rasterkraftmikroskopischen Messmethoden. Damit gelingt es, wie im Contact-Mode (CMAFM), topografische Informationen von Objektoberflächen mit sehr hohem Signal-Rausch-Verhältnis zu akquirieren. Der sogenannte Non-Contact-Mode

(NCAFM) ist hinsichtlich dieses Punktes eindeutig unterlegen, birgt aber die Möglichkeit, Oberflächen quasi berührungsfrei und ohne konsekutive mechanische Alterationen durch den Scanprozess selbst abzubilden. Die Anwendung des Tapping-Mode an visko-elastischen Objekten, insbesondere an lebenden Zellen versprach hohe Auflösungen, bei minimaler Objektalteration erreichen zu können.<sup>59</sup> Leider war die Etablierung dieser Methode an vitalen Zellsystemen hauptsächlich durch die Schwierigkeit gebremst, dass Abbildungen in physiologischen Medien initial äußerst problematisch waren. Die theoretischen Hintergründe des TMAFM und dessen Anwendbarkeit in Flüssigkeiten wurden von Hansma 1994 aufgezeigt.<sup>60</sup> Schon ein Jahr später wurden beeindruckende Abbildungen nativer, nucleosomaler Substrukturen des Chromatins der Minichromosomen von *Tetrahymena thermophila* mittels Tapping-Mode-AFM generiert.<sup>61</sup> Die praktische Bedeutung dieses Abbildungsmodus für die Darstellung weicher, biologischer Strukturen belegt die 1996 publizierte Arbeit von Physikern der Humboldt-Universität zu Berlin nachdrücklich.<sup>62</sup> Schabert et al. vermessen die vertikalen Dimensionen bekannter und bereits sehr gut charakterisierter Untersuchungsobjekte (Tabak-Mosaic-Virus, T4-Bacteriophagen-Köpfe, Purpirmembranen, HPI-Layer) nach rasterkraftmikroskopischer Darstellung dieser Strukturen im CM- und TMAFM. Sie konnten zeigen, dass insbesondere im Contact-Mode auftretende Reibungskräfte zwischen Objekt und Messspitze zur Alteration der Objektoberfläche führen. Diese Lateralkräfte treten bei Abbildung derselben Strukturen mittels TMAFM nicht auf. Bei Frequenzen des oszillierenden Cantilevers (Tapping-Frequenz) von zirka 10 kHz ist durch diese Methode gleiche vertikale Auflösung zu erreichen, wie im Contact-Mode. Die laterale Auflösung (horizontale Bildebene) der CMAFM ist durch TMAFM nicht zu erreichen. Besondere Bedeutung für die weitere Etablierung der Rasterkraftmikroskopie an vitalen Zellen erlangte Radmachers biophysikalische Abhandlung über die Besonderheiten der Darstellung weicher und fluider Objekte.<sup>63</sup>

## 1.4 Rasterkraftmikroskopie in der kardiovaskulären Grundlagenforschung – Ein Überblick

Reale 3-dimensionale Abbildungen von Membranen und eingebetteten Biomolekülen mit molekularer und submolekularer Auflösung unter zellphysiologischen Untersuchungsbedingungen, die Visualisierung zelldynamischer Prozesse, die Detektion intermolekularer Wechselwirkungskräfte, die Mikromanipulation und Nanodissektion von biomolekularen Strukturen und weitere interessante Optionen der Rasterkraftmikroskopie erklären das ausgeprägte Interesse der Biowissenschaftler an dieser faszinierenden, mikroskopischen Methode. Insbesondere die Kombination der rasterkraftmikroskopischen, topografischen Information mit anderen, oberflächendefinierenden Parametern (z.B. lokale Elastizitäten) und anderen mikroskopischen Techniken (Konfokale Laserscanmikroskopie) bietet neue morphologisch- funktionelle Untersuchungsansätze. Gegenwärtig sind die grundlegenden biophysikalischen Erkenntnisse in der Rasterkraftmikroskopie wertvolle Hilfsmittel für Biologen und Biomediziner bei der Anwendung der „Atomic Force Microscopy“ an kardiovaskulär relevanten Zellen und Strukturen. De facto müssten alle biologischen Objekte, die rasterkraftmikroskopisch untersucht wurden, im Kontext kardiovaskulärer Struktur- und Funktionsaufklärung erwähnt werden, da an nichtkardialen bzw. nichtvaskulären Strukturen gewonnene Erkenntnisse elementare

Voraussetzungen für die im folgenden kursorisch beleuchteten Ergebnisse auf dem Gebiet der Herz- Kreislaufforschung darstellen.

Kordylewski verglich an gefriergetrockneten Replicas atrialen Gewebes der Ratte, die morphologischen Auflösungsmöglichkeiten der Rasterkraftmikroskopie und der Elektronenmikroskopie.<sup>64</sup> Dabei belegte er, dass sehr gute Korrelationen zwischen den Methoden hinsichtlich der Morphologie größerer zellulärer Strukturen, wie Zellkerne und Mitochondrien besteht. AFM-Untersuchungen im molekularen Bereich wiesen gegenüber der elektronenmikroskopischen Darstellung derselben Strukturen jedoch erhebliche Unterschiede auf. Die Arbeit verdeutlicht, dass die real 3-dimensionale Oberflächenmorphologie mittels AFM detaillierter und akkurater an den beschriebenen Replicas aufgeklärt werden kann, als dies durch die elektronenmikroskopische Abbildung möglich ist. Lal und John veröffentlichten Bilder lebender atrialer Kulturmyozyten mit einer lateralen Auflösung von weniger als 20 nm, die zytoskelettale- und Sarkomerstrukturen unter der Zellmembran erkennen ließen.<sup>65</sup> Die nanomanipulatorische, AFM-gestützte Präparation und Abbildung kardialer gap-junctions wurde bereits erwähnt. AFM- Abbildungen luftgetrockneter nicotinerger Acetylcholinrezeptoren der *Xenopus* Eizellen ergaben, dass der Rezeptor einen Gesamtdurchmesser von 113 Å und einen Öffnungsdurchmesser von ca. 40 Å hat. Auch hier wurden die strukturanalytischen AFM-Daten mit röntgenkristallografischen und elektronenmikroskopischen Daten verglichen, wobei wiederum die Rasterkraftmikroskopie im Hochauflösungsbereich detailliertere und exaktere Informationen lieferte. 1996 berichtete Arnsdorf, dass seine Gruppe die Struktur des  $\beta$ -Rezeptors rasterkraftmikroskopisch untersucht. Erste, unveröffentlichte Daten ließen nach seiner Meinung die Hoffnung zu, dass  $\beta$ -Rezeptor-Rezeptorantagonist-Bindungsstudien reproduzierbare Ergebnisse liefern werden.<sup>66</sup> Nach aktueller Literaturlage scheint dies bis heute am  $\beta$ -Rezeptor nicht gelungen zu sein.

## 2 Zielsetzung der Arbeit

Das Studium der umfangreichen Literaturquellen, die sich mit der Rasterkraftmikroskopie und verwandten Techniken befassen, lässt sehr schnell erkennen, dass die theoretischen Möglichkeiten der Rasterkraftmikroskopie insbesondere im biologisch- medizinischen Bereich einerseits völlig neue Untersuchungsansätze- und Philosophien zulassen, andererseits jedoch mit erheblichen präparativen und abbildungstechnischen Problemen behaftet sind. Relativ schnell erreicht man nach Erlernen der rasterkraftmikroskopischen Basiskenntnisse, optimaler Installation des Mikroskops und nach Anwendung einfacher bildverarbeitender Filtertechniken beeindruckende Abbildungen kristalliner Strukturen [z.B. Glimmer = Gruppe gesteinsbildender Silikatminerale (Alumosilikate) mit der allgemeinen chemischen Zusammensetzung  $M'M_3'''((OH)_2/AlSi_3O_{10})$  oder  $M'M_2'''((OH)_2/AlSi_3O_{10})$ ] im atomaren Auflösungsbereich. Schnell werden Abbildungsprozedere und Probenpräparation solcher Objekte zur Routine und es gelingen hochauflösende, reproduzierbare Abbildungen dieser Objektoberflächen. Die Ernüchterung nach diesen "Initialerfolgen" stellt sich spätestens dann ein, wenn man versucht, morphologische Studien an biologischen Objekten (Zellen, Membranproteine) mit rasterkraftmikroskopischen Methoden durchzuführen. Die Etablierung der objektspezifischen Präparationstechniken und vor allem die Optimierung der vielfältigen AFM-Abbildungsmöglichkeiten gelingt häufig nur nach genauer Analyse der biophysikalischen Eigenschaften der Untersuchungsobjekte. Verallgemeinernd lässt sich formulieren, dass die Erfahrungen, welche man bei der rasterkraftmikroskopischen Abbildung fester, kristalliner Strukturen gewonnen hat, auf weiche, zumeist fluide biologische Objektoberflächen nur begrenzt, um nicht zu sagen kaum anwendbar sind. So ist die Alteration kristalliner Untersuchungsobjekte durch den rasterkraftmikroskopischen Abbildungsprozess vernachlässigbar und damit durch die Auswahl geeigneter Messspitzen leicht zu beherrschen. Im Gegensatz dazu sind biologische Proben während des Abbildungsprozesses höchst vulnerabel. Außerdem ergeben sich Probleme dadurch, dass vitale biologische Systeme (z.B. Zellmembranen und darin eingebettete Struktur- und Funktionsproteine) durch zelldynamische Prozesse charakterisiert sind und demzufolge diese molekularen Strukturen in Abhängigkeit vom Funktionszustand einer ständigen Veränderung unterliegen. Um vitale biologische Strukturen der rasterkraftmikroskopischen Untersuchung zuzuführen, müssen diese auf dem Objektträger immobilisiert werden ohne dabei den Funktionszustand wesentlich zu beeinflussen. Die Qualität der rasterkraftmikroskopischen Abbildung ist also immer ein Produkt aus experimentorientierter optimaler Probenpräparation und der richtigen Auswahl der rasterkraftmikroskopischen Abbildungsparameter. Langfristig erscheint die simultane Visualisierung dieser zelldynamischen Prozesse in Verbindung mit hochaufgelösten morphologischen Strukturanalysen mittels rasterkraftmikroskopischer Techniken vorstellbar. Essentielle Voraussetzung dafür ist, dass entsprechende Membranoberflächen dieser Zellen der AFM-Abbildung zugänglich gemacht werden.<sup>67,68</sup> Ein Ziel dieser Arbeit soll darin bestehen, kardiovaskulär relevante Zellen in vivo rasterkraftmikroskopisch abzubilden. Die zu untersuchenden Zellen stammen aus etablierten immortalen Kulturzelllinien und aus Primärzellkulturen. Außerdem sollen aortale Endothelzellen im Gewebsverband untersucht werden.<sup>69</sup> Neben Endothelzellen unterschiedlicher Herkunft sollen Kardiomyozyten, Fibrozyten und fibroblastenähnliche Zellen (FLC) in vivo rasterkraftmikroskopisch abgebildet werden. Hierbei steht die präparatorische und



technisch aufwendige Etablierung der „Atomic Force Microscopy“ an lebenden, kardiovaskulär relevanten Zellen primär im Mittelpunkt. Die Literatur bezüglich der Rasterkraftmikroskopie an Zellen und zellulären Strukturen verdeutlicht, dass der Etablierungsprozess der Methodik zumeist mit der Abbildung luftgetrockneter Zellen unter Raumbedingungen<sup>70,71</sup> beginnt und über verschiedene Modifikationen der Zellpräparation (z.B. Glutardialdehydfixation<sup>72,73,74</sup> Cryofixation<sup>75</sup>), des Abbildungsmodus (Contact-, Non-Contact-, Tapping-Mode) und der Abbildungsbedingungen (Raumbedingungen, zellphysiologische Umgebung) schließlich die Abbildung vitaler Zellen (z.B. kultivierte Zellen aus Pleurapunktat eines Patienten mit metastasierendem Bronchialkarzinom<sup>76</sup>) ermöglicht wird. An stabilen oder künstlich stabilisierten Strukturen der Zellen sollen erste orientierende Messungen der bioelastischen Eigenschaften (Kraft-Abstands-Kurven) durchgeführt werden.<sup>77</sup> Andere hochauflösende strukturanalytische Verfahren (z.B. TEM) erfordern aufwendige Präparationen der zu untersuchenden Objekte und sollen, falls im Einzelfall technisch und apparativ möglich, als Referenzuntersuchungen herangezogen werden.

Neben der rasterkraftmikroskopischen Darstellung der Oberflächen verschiedener kardiovaskulärer Zellen besteht ein weiteres Ziel dieser Arbeit darin, speziell präparierte Einzelproteine der AFM-Untersuchung zu unterziehen. Ein strukturanalytisch durch Elektronenmikroskopie und Röntgendiffraktionsanalyse sehr gut beschriebenes Funktionsprotein, welches bei der non-lysosomalen, intrazellulären Proteolyse eine entscheidende Rolle spielt, ist das Proteasom. Die 20S-Untereinheit dieses komplexen Proteins soll mittels Rasterkraftmikroskopie abgebildet und vermessen werden. Auf diesem Weg gewonnene strukturanalytische Daten werden mit den bekannten strukturellen Abmessungen des Proteins verglichen und mögliche Abweichungen sollen methodisch diskutiert werden.

Die Tatsache, dass AFM-Technologie real 3-dimensionale, quasi atomare Auflösung an festen Materialien ohne weiteres ermöglicht, eröffnet ein weiteres, aus kardiologischer Sicht interessantes Anwendungsgebiet. Interventionelle Materialien, die in der täglichen kardiologischen Praxis Anwendung finden sind hinsichtlich ihrer Ultrastruktur und der dadurch beeinflussbaren Gewebekompatibilität häufig nur im Grosstiermodell getestet. Als hochsensitive Methode im Nahfeld von Objektoberflächen bietet die Rasterkraftmikroskopie die Möglichkeit, interventionelle Materialien bezüglich ihrer Oberflächenbeschaffenheit sehr detailliert qualitativ und quantitativ zu beschreiben. Koronare Stents sind heutzutage in der Therapie der koronaren Herzkrankheit nicht mehr entbehrlich. Neben strömungsmechanischen Einflüssen, der Ladungsverteilung<sup>78</sup> innerhalb der Stentlegierungen (Fe316L-Stahl) und rein hämostaseologischen Kriterien erscheint möglich, dass die zelluläre Adhäsion von Thrombozyten an den Oberflächen der koronarinterventionellen Materialien auch durch die luminale Oberflächentopografie dieser Stents beeinflussbar ist. Die AFM-Untersuchung erlaubt, unterschiedliche Stents hinsichtlich ihrer Oberflächenrauigkeit sehr präzise zu untersuchen.<sup>79</sup> Im Rahmen dieser Arbeit werden diese Analysen an einem klinisch zur Anwendung kommendem Stenttypen (Palmaz-Schatz-Stent) exemplarisch durchgeführt. Es soll untersucht werden, inwieweit das Dilatationsprocedere Einfluss auf die Stentmorphologie hat. Das bedeutet, dass Stents sowohl im nativen Zustand, als auch im dilatierten Zustand untersucht werden. Außerdem sollen im Anschluss an diese Untersuchungen die einzelnen, präparierten Stents mit humanen Thrombozytenkonzentraten inkubiert werden, um zunächst rein morphologisch die Zell-Stentoberflächenkontakte und mögliche, Stentoberflächen- induzierte Veränderungen der Thrombozyten zu

beschreiben. Vorarbeiten auf diesem Gebiet sind in der Arbeit von Siedlecki und Marchant beschrieben, die Biomaterial-Zell-Interaktionen auf molekularer Ebene mittels rasterkraftmikroskopischer Techniken untersuchten.<sup>80</sup> Sollte diese beschriebene Präparation nach entsprechender Zellinkubation rasterkraftmikroskopisch unter physiologischen Bedingungen darstellbar sein, ergibt sich langfristig die Möglichkeit beispielsweise die thrombozytäre Adhäsionsstärke mit einer modifizierten AFM-Methode, die im angloamerikanischen Sprachraum "Cell adhesion force microscopy"<sup>81</sup> genannt wird, zu untersuchen.

### 3 Materialien und Methoden

#### 3.1 Grundlagen der Rasterkraftmikroskopie

##### 3.1.1 Prinzipieller Aufbau des AFM

Das Rasterkraftmikroskop gehört zu der großen Familie der im angloamerikanischen Sprachraum als „Scanning Probe Microscopes“ bezeichneten Rastersonden-Mikroskope, deren gemeinsame Eigenschaft das lokal hochaufgelöste Erfassen von Objekteigenschaften im Nahfeld von Oberflächen ist. Demzufolge unterscheidet sich der prinzipielle Aufbau aller Rastersondenmikroskope kaum. Auf die Modifikationen der Sonden, der damit detektierbaren unterschiedlichen Messsignale und der sich daraus ableitenden Mikroskoptypen wird weiter unten detailliert eingegangen. Hinsichtlich der diversifizierten Terminologie der Methode sei klärend bemerkt: Das der Rasterkraftmikroskopie zugrundeliegende Messprinzip hat der Methode ihren Namen verliehen. Wir sprechen häufig von der „Atomic force microscopy (AFM)“ und definieren damit das im folgenden zu beschreibende Messprinzip.

Die elementaren Bestandteile der Rasterkraftmikroskope sind in Abbildung 3 schematisch zusammengefasst.

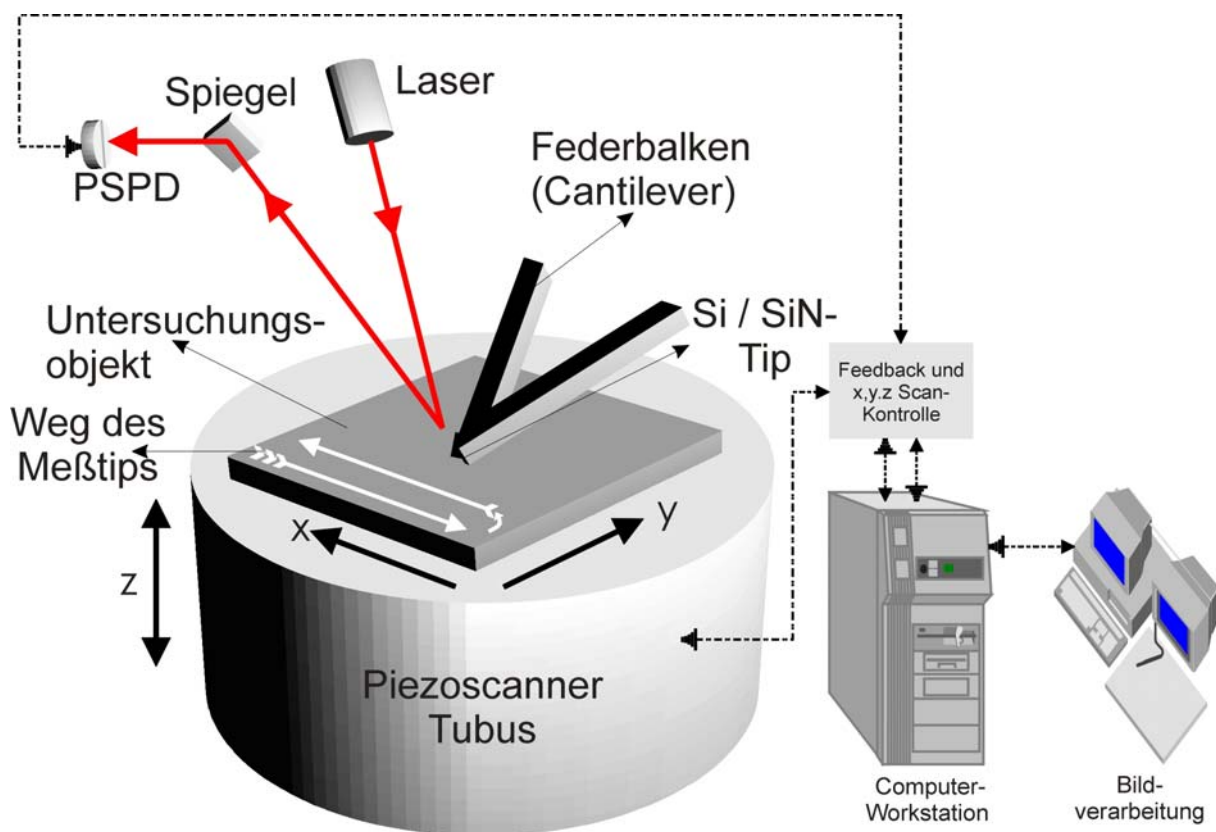


Abbildung 3 modifiziert nach <sup>14</sup>

Eine, im Idealfall atomar spitze Nadel (Messtip), die nur wenige Mikrometer lang, weniger als 100 Angström dick und am freien Ende eines Federbalkens (Cantilever) befestigt ist, wird mit Hilfe einer mikromotorisch gesteuerten Feinmechanik in den Nahbereich (2-100 Å) der Oberfläche des Untersuchungsobjektes gebracht. Der zwischen Atomen dieser Spitze und Atomen der Probenoberfläche aufgrund interatomarer Wechselwirkungen entstehende Kraftgradient wird auf den Cantilever

übertragen, dessen Auslenkung mittels unterschiedlicher Methoden detektiert werden kann. Als Messsignal aller Rasterkraftmikroskope wird also der, in seiner Komplexität noch zu beschreibende Kraftgradient zwischen Messtip und Probe verwendet. Die Auslenkung des Federbalkens wird heutzutage bei den meisten, kommerziell verfügbaren Mikroskopen durch einen auf die goldbedampfte, reflektierende Rückseite des Cantilevers adjustierten Laserstrahl an eine positionssensitive 2- oder 4-Felder-Photodiode (PSPD) weitergegeben, die Deviationen dieses Laserstrahls detektiert und in elektrische Spannungen umwandelt. Um die Topografie der Probenoberfläche abzubilden, ist es notwendig, die beschriebenen Interaktionen nicht nur punktuell zu messen, sondern ein definiertes x-y-Punktraster in der Probenebene (üblicherweise 256x256 oder 512x512 Punkte) zu erfassen. Diese hochpräzise x-y-Translation realisiert ein piezokeramischer Scanner, der - in Abhängigkeit von der Länge des Scantubus und der angelegten Steuerspannung - verschieden große Areale abrastern kann. Dazu muss die Probe mit dem Scanner mechanisch gekoppelt werden. Hierfür haben sich magnetische Probenträger bewährt. Neben der präzisen Bewegung des Scanners in der Probenebene ermöglicht die spezielle Anordnung piezokeramischer Elemente eine weitere Bewegungskomponente in z-Richtung (senkrecht zur Probenoberfläche). Über einen Rückkopplungsmechanismus wirkt das detektierte Messsignal auf das piezokeramische z-Stellglied und gewährleistet, dass die Interaktionskraft an jedem Punkt innerhalb des x-y-Rasters konstant gehalten wird ("Constant-Force-Mode"). Die Position des z-Stellgliedes, die durch das umgewandelte PSPD-Messsignal jedes x-y-Punktes bestimmt wird, ergibt in Kombination mit den dazugehörigen x-y-Koordinaten ein dreidimensionales Abbild der Oberflächentopografie. Bei bekanntermaßen atomar flachen Proben (Einkristalle, Mica etc.) ist es möglich, den beschriebenen Feed-back-Mechanismus zu umgehen, um höhere zeitliche Auflösung zu erzielen ("Constant-Height-Mode"). Die so ermittelten x-y-z-Koordinaten der Probenoberfläche werden computergestützt prozessiert und gespeichert. Jede x-y-z-Koordinatenkombination besteht zunächst aus drei Spannungswerten:

- die x-y-Werte entsprechen den Spannungen, die nötig sind um den piezokeramischen Scanner bis zum entsprechenden x-y-Objektpunkt zu bewegen,
- der z- Wert entspricht der Spannung, die am Piezo anliegt, um diesen in Abhängigkeit vom Messsignal in vertikaler Richtung (z-Richtung) zu bewegen (Constant-Force-Mode), oder der Spannung, die direkt an der PSPD abgeleitet werden kann (Constant-Height-Mode)

Der DSP-(Digital Signal Processing) Chip des Computer ordnet den Spannungswerten numerische x-y-z-Werte zu und bildverarbeitende Software realisiert die z-Wert assoziierte Zuordnung von Grau- bzw. Farbstufen zu jedem x-y-Bildpunkt. Um zu gewährleisten dass die gemessenen x-y-z-Werte die reale Oberflächentopografie wiedergeben, wird der Scanner in regelmäßigen Abständen, mit Hilfe definierter Längen- und Höhenstandards (Kalibrierungsgitter s.u.) kalibriert.

### 3.1.1.1 PSI Autoprobe CP modifiziert nach 82

Das im Rahmen dieser Arbeit angewandte Mikroskop „Autoprobe CP“ (Abbildung 4) ist ein Produkt der Firma PSI (Park Scientific Instruments). Es ist mit einem 100- $\mu\text{m}$ -Scanner (maximales Probenareal: 100  $\mu\text{m}^2$ ) und einem 5- $\mu\text{m}$ -Scanner (maximales Probenareal: 5  $\mu\text{m}^2$ ) ausgerüstet. Zur Messsignaldetektion wird eine Laserdiode ( $\lambda =$

600 – 700 nm) mit 0,2 mW maximaler Ausgangsleistung eingesetzt. Die Annäherung des Messtip, welcher austauschbar in eine vertikal bewegliche Arbeitsbühne integriert ist, an die Objektoberfläche wird durch 3 feinmechanische Schrittmotoren

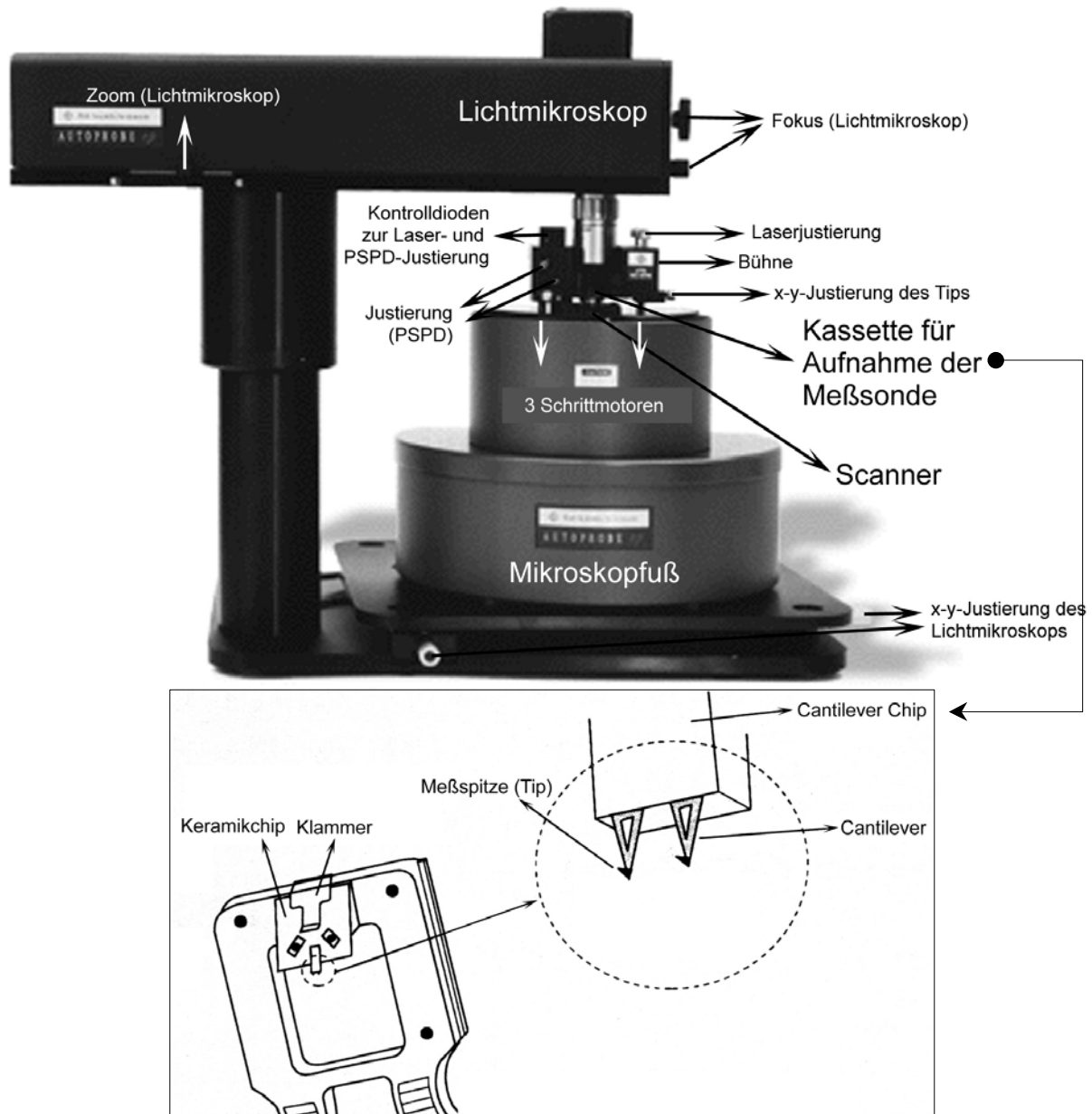


Abbildung 4 modifiziert nach <sup>82</sup>

(0,4  $\mu\text{m}$ /pro Schritt; maximale Geschwindigkeit 2,0 mm/s) realisiert. Zur manuellen Ausrichtung des Objektes, Laserjustierung und zur Positionierung der Messspitze über der zu untersuchenden Region auf der Objektoberfläche dient ein Lichtmikroskop (Objektiv 10- bis 50fach stufenlos), das über eine hochauflösende CCD-Kamera mit einem Videomonitor verbunden ist. Zusätzlich verfügt das System über Scan-Linearitätssensoren, eine Hardware-Komponente, die intrinsische Nonlinearitäten (s.u.) des piezokeramischen Scanners ausgleicht.

Die verarbeitende und steuernde Computereinheit hat folgende Charakteristik:

- CPU: 50 MHz, 486 Prozessor, 256 KByte cache memory, 32 MByte RAM
- Speicher: 1 GByte Festplatte

- Betriebssystem: Windows 95 / später Windows 98
- Software: PSI ProScan 1.5 für Mikroskopsteuerung und Bildverarbeitung

### 3.1.2 Das lokale Experiment – Grundlage der verschiedenen Rastersondenmikroskope modifiziert nach 83

Wie bereits beschrieben, ermöglichen Rastersondenmikroskope das lokal hochaufgelöste Erfassen von Objekteigenschaften im Nahfeld von Untersuchungsoberflächen. Im Falle der Rasterkraftmikroskope erreicht man atomare Auflösung an kristallinen Strukturen, indem eine atomar spitze Sonde mit einem sehr geringen Wechselwirkungsvolumen der zu untersuchenden Objektoberfläche in Wechselwirkung tritt. Dabei bilden interatomare Kräfte zwischen Sonde und Objektoberfläche die Grundlage für die mikroskopische Abbildung der topografischen Objektinformationen. Bekanntermaßen sind Oberflächen amorpher, kristalliner und biologischer Objekte nicht ausschließlich durch ihre topografischen Informationen definierbar. Andere Eigenschaften, wie die elektrische Leitfähigkeit, die Verteilung magnetischer und elektrostatischer Felder, die Ionenstromverteilung an biologischen Proben, die chemische Zusammensetzung, die Elastizität bzw. Viskosität von Oberflächen oder auch die Rezeptor-Ligand-Interaktionsstärke bestimmter Oberflächenproteine, um nur die wichtigsten zu nennen, sind für die Objektcharakterisierung mindestens genauso interessant. Im Falle der Rasterkraftmikroskopie ermöglicht das "lokale Experiment", Kräfte im Bereich einiger Piconewton zu detektieren. Erreicht wird dies durch die im Rahmen des Nahfeldexperiments gewählte Messsonde (Silizium-Siliziumnitrid-Spitze). Möchte man hingegen die o.g. Eigenschaften der Oberfläche mit hoher lokaler Auflösung detektieren, so kann dies nur mittels spezieller Modifikation der Messsonde erreicht werden. Häufig sind die Geräte optional so ausgelegt, dass mehrere Eigenschaften simultan detektierbar sind. Dadurch können z.B. die Verteilung von Elastizitäten oder die Ladungsverteilung mit der topografischen Morphologie der Oberflächen assoziiert werden. Die Vielfalt der sich daraus ergebenden Rastersondenmikroskope, die bis heute zur Anwendung kommen, wird unter 3.2 beschrieben. Somit ist die Entwicklung neuer Rastersondenmikroskope nur eine Frage der Kreativität der Anwender. Spezifische Oberflächen-assoziierte Fragestellungen werden in Zukunft zunehmend dazu führen, dass man die Messsonden und damit das "lokale Experiment" entsprechend dieser Fragestellung modifiziert. Das allen Rastersondenmikroskopen zugrundeliegende Messprinzip wird also nur hinsichtlich des im Oberflächennahfeld interagierenden Wechselwirkungsvolumens (Messsonde) verändert, um neue Rastersondenmikroskope für neue Fragestellungen zu entwickeln.

### 3.1.3 Kräfte in der AFM

Als Messsignal wird in der Rasterkraftmikroskopie der Kraftgradient zwischen einer Sondenspitze und der zu untersuchenden Objektoberfläche verwendet. Diese Kräfte entstehen im Nahfeld von Oberflächen (0 - 100Å) durch die Interaktionspotentiale zwischen den Atomen der Messspitze und Atomen der Objektoberfläche.

Interatomare Wechselwirkungspotentiale ( $w$ ) werden durch die Lennard-Jones-Funktion mathematisch beschrieben:

$$w(d) = \frac{C_1}{d^{12}} - \frac{C_2}{d^6},$$

wobei ( $d$ ) der Abstand der Atome ist und

( $C_1, C_2$ ) Konstanten sind.

$C_1/d^{12}$  beschreibt dabei den abstoßenden Teil der interatomaren Kräfte, welcher hauptsächlich durch ionische- und Paulipotential entsteht. Diese Abstoßung tritt nur auf, wenn Körper sich auf weniger als 2 Å annähern. Sie ist demzufolge nur sehr kurzreichweitig. In größeren Abstandsbereichen zwischen 2 Å und 100 Å ziehen sich Atome zweier Körper gegenseitig durch „van der Waals Kräfte“ an. Van der Waals Kräfte entstehen durch die Wechselwirkung fester Dipole, fester Dipole mit induzierten Dipolen und induzierter Dipole mit induzierten Dipolen und können anziehend aber auch schwach abstoßend wirken. Ihre Abstandsabhängigkeit wird in der Lennard-Jones-Funktion durch den Term  $C_2/d^6$  definiert. Die größere Reichweite dieser Wechselwirkung bedingt, dass nur die vorderen Spitzenatome der Messsonde

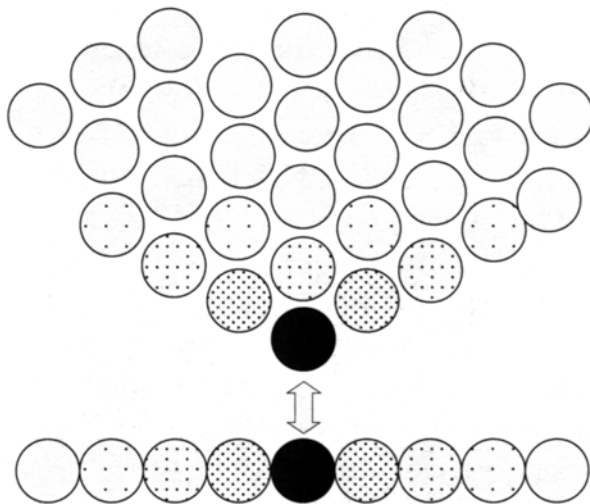


Abbildung 5 aus <sup>85</sup>

effektiv mit den Atomen der Objektoberfläche interagieren und die Summe aller atomaren Interaktionen das Ausmaß der Anziehung oder Abstoßung bestimmt. Die Kraftbeträge liegen im Bereich zwischen 1 nN und 1 pN. Wie groß diese Kraft ist und ob abstoßende oder anziehende Kräfte dominieren, ist also einerseits vom Abstand zwischen den Atomen, andererseits aber auch von deren räumlicher Anordnung abhängig, da im Falle einer atomar spitzen AFM-Messsonde eben nicht nur die vordersten Spitzenatome interagieren. (Abbildung 5). So werden in Abhängigkeit vom Messtip-Objekt-

abstand die vordersten Spitzenatome beispielsweise durch ionische- oder Pauliabstoßung beeinflusst, wogegen andere Atome im Wechselwirkungsbereich anziehende van der Waals Kräfte aufeinander ausüben. Selbstverständlich bestehen diese Interaktionen auch innerhalb des Silizium- bzw. Siliziumnitrid-Atomgitters des Messtips zwischen benachbarten Atomen. Neben den erwähnten ionischen-, Pauli- und van der Waals-Kräften spielen eine Reihe anderer Einflüsse eine wichtige Rolle. Bei der rasterkraftmikroskopischen Untersuchung von Oberflächen bildet sich unter Raumbedingungen luftfeuchtigkeitsbedingt auf der Objektoberfläche und an der Messspitze ein hauchdünner Wasserfilm aus. Zwischen diesen Feuchtigkeitsfilmen entstehen bei Annäherung von Messsonde und Objekt stark adhäsive Meniskuskräfte (~100 nN) durch Ausbildung von Wasserbrücken. Durch die mikroskopische Untersuchung in Flüssigkeiten (z.B. zellphysiologische Puffermedien) wird diese unerwünschte Interaktionskraft eliminiert. In wässriger Lösung spielen stark repulsive Kräfte zwischen Objekt und Sondenspitze (sog. double-layer-repulsion) eine Rolle, deren Stärke von der Ionenstärke der Lösung und von der Aufladung von Spitze und Objekt abhängt. Chemisorption, Physisorption und metallische Adhäsion generieren anziehende interatomare Potentiale.

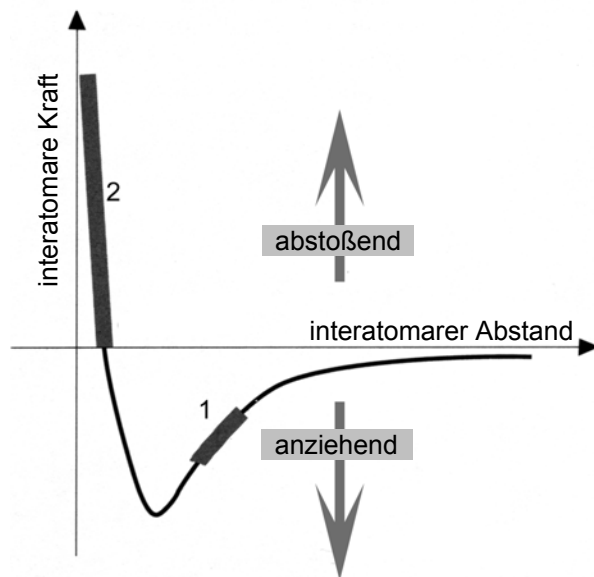


Abbildung 6

Lennard- Jones- Funktion interatomarer Wechselwirkungen

Der Abstand zwischen Objektoberfläche und Spitze der Messsonde (Tip) kann durch pikometergenaue Stellmechanik (z-Bewegung des Scanners und mikrometergenaue Schrittmotoren) sehr präzise eingestellt werden. Dies ermöglicht für rasterkraftmikroskopische Untersuchungen prinzipiell zwei Messmethoden. Im sogenannten Contact-Mode hat die Messspitze physikalischen Kontakt zur Objektoberfläche, wobei die Auflagekraft ( $\sim 1 - 100 \text{ pN}$ ) von den Federeigenschaften des Cantilevers abhängig ist. Berührt die Spitze die Objektoberfläche nicht, spricht man vom Non-Contact-Mode. Dabei schwebt die Messspitze in einem Abstand von maximal  $100 \text{ \AA}$  über der Objektoberfläche und es dominieren anziehende interatomare Kräfte.

Abbildung 6 verdeutlicht die erläuterten Zusammenhänge in vereinfachter Form. Verringert man den Abstand zwischen Messsonde und Objektoberfläche so kommt es im Nahfeldbereich der Oberfläche zunächst zu inkrementalem Anstieg der anziehenden interatomaren Potentiale (vorwiegend van der Waals Kräfte). In diesem Abstandsbereich bewegt sich die Messsonde im Non-Contact-Mode über der Objektoberfläche (1). Je näher die Messspitze an die Probe angenähert wird, umso stärker gewinnen repulsive interatomare Potentiale Einfluss, so dass die noch anziehend wirkende Nettokraft wieder abnimmt bis die Sondenspitze die Oberfläche des Untersuchungsobjektes berührt (2). Jetzt dominieren abstoßende interatomare Kräfte (ionische- und Pauliabstoßung), obgleich auch Interaktionen zwischen weiterentfernten Atomen (siehe Abbildung 5) schwache anziehende Kräfte generieren. Die Komplexität dieser, hier beschriebenen Wechselwirkungskräfte und deren multifaktorielle Abhängigkeit erschwert die Anwendung der Rasterkraftmikroskopie insbesondere an biologischen Proben erheblich. Häufig zwingt sie den Anwender, die optimalen Abbildungsbedingungen für jedes neue Untersuchungsobjekt empirisch zu ermitteln und zu optimieren.

### 3.1.4 Die Scannereinheit modifiziert nach 84

Das extrem hohe Auflösungspotential der Rastersondenmikroskope wird im besonderen durch eine piezokeramische Präzisionsmechanik gewährleistet, welche die Messsonde relativ zur Objektoberfläche bzw. die Oberfläche relativ zur Sonde bewegt.

#### 3.1.4.1 Design und Funktionsweise

Diese Präzisionsrastereinheiten, im folgenden als Scanner bezeichnet, bestehen aus piezokeramischem Material (vorwiegend Blei-Zirkonium-Titanat (PZT)) und



verformt sich das Kristallgitter, was zur Kontraktion bzw. Expansion des Körpers um den Betrag  $x_0$  führt (indirekter piezoelektrischer Effekt):

$$x_0 = k \sqrt{\frac{C}{C^*}} U$$

wobei (k) den materialabhängigen, piezoelektrischen Kopplungsfaktor beschreibt,

(C) die elektrische Kapazität ist und

(C\*) die mechanische Steifigkeit des Körpers charakterisiert.<sup>84</sup>

Natürliche Piezo-Polykristalle bestehen aus ungeordneten Einzelkristallen, wobei jede dieser monokristallinen Strukturen ein eigenes elektrisches Dipolmoment besitzt. Diese Dipolmomente bilden die theoretische Basis des erwähnten piezoelektrischen Effektes.

### 3.1.4.1.2 Herstellung piezokeramischer Präzisionsscanner

Materialien mit piezoelektrischen Eigenschaften werden aus metallischen Pulvern der Einzelkomponenten (z.B. Blei, Titan, Zirkonium) durch Sinterungsprozesse hergestellt. Die Dipolmomente der Monokristalle in diesen Rohpiezos sind jedoch unausgerichtet, so dass die gerichtete Bewegung eines daraus gefertigten Scanner-

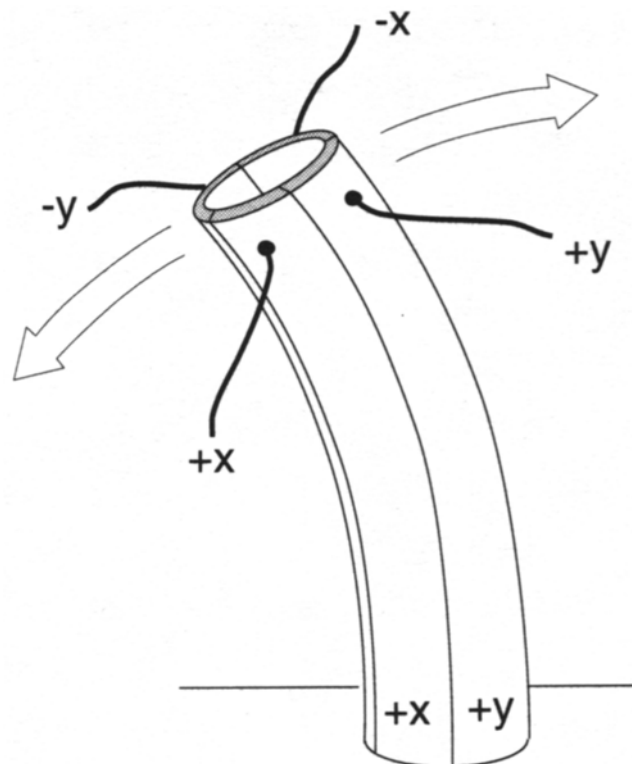


Abbildung 8 aus <sup>85</sup>

Tubus quasi unmöglich wäre. Deshalb wird nach Erhitzen auf über 200°C eine DC-Spannung über mehrere Stunden an die gesinterten Scanner-Tuben angelegt, um die ungeordneten Dipolmomente auszurichten. Nach Abkühlen des Scanners verbleiben die neuorientierten Dipolkristalle in der ausgerichteten Formation, wodurch eine spannungsabhängig sehr genau definierte Bewegung des Scanners erreicht wird. Der im "PSI Autoprobe CP"-Mikroskop und in vielen, kommerziell verfügbaren Rastersondenmikroskopen integrierte Scanner ist nach dem Prinzip der unterteilten Tubus-Anordnung von piezokeramischen Elementen ("segmented-tube-design") aufgebaut (siehe nebenstehende Abbildung 8). Dieses Piezorohr ist in vier gleiche Sektoren in Richtung der Rohrachse unterteilt. An gegenüberliegende Segmente wird eine, relativ zur inneren Elektrode entgegengesetzte Spannung angelegt.

Durch die erzeugte Bewegung des Piezorohres kann jeder Punkt innerhalb eines 2-dimensionalen, horizontalen x-y-Gitters angesteuert werden. Die vertikale Bewegung des Scanners (z-Komponente, Messsignal für Constant-Force-Mode) ermöglicht ein zentral angeordnetes Piezoelement (innere Elektrode).

### 3.1.4.2 Eigenresonanz, maximale Scanfrequenz- und geschwindigkeit

Wie bereits ausgeführt, wird das räumliche Auflösungsvermögen der Rastersondenmikroskope definitiv nicht durch den Scanner eingeschränkt. Betrachtet man das zeitliche Auflösungsvermögen der Methode, erkennt man sofort, dass hierbei der Scanner die limitierende Komponente zu sein scheint. Den Scanprozess als Schwingungsvorgang zwischen zwei benachbarten Punkten der Scanmatrix begreifend, sieht man, dass die Scanfrequenz (Hz) sehr hoch sein muss, um hohe zeitliche Auflösung zu erreichen. Zur Verdeutlichung sei folgendes, sehr vereinfachtes Beispiel angeführt: Ein rastersondenmikroskopisches Bild, das aus 512x512 Bildpunkten bestehen soll, enthält 262144 x-y-z-Koordinatenpaare. Bei 1000 Punkten/s (Hz) würde die Abbildung ungeachtet aller anderen Einflüsse (Computerrechenzeit, Nonlinearitätsausgleich etc.) ca. 4'22" dauern. Bei 10 KHz dauerte dies immer noch 26 s, bei 20 KHz 13 s. In diese Berechnung gehen die z-Stellbewegungen des Scanners an jedem x-y-Punkt nicht mit ein, so dass im üblichen Constant-Force-Mode" deutlich längere Abbildungszeiten zu erwarten sind. Die Eigenfrequenzen moderner Scanner liegen im Bereich zwischen 1 kHz und 20 kHz. Die piezokeramischen Elemente sollten allerdings während des Scansvorganges unterhalb ihrer Eigenfrequenz angesprochen werden, um unkontrollierte und destruierende Resonanzschwingungen zu vermeiden. Dies bedeutet, dass für die Untersuchung funktioneller, zellphysiologischer Phänomene wünschenswerte zeitliche Auflösungen im Bereich weniger Millisekunden bei entsprechend hoher räumlicher Auflösung theoretisch unmöglich sind. Bildet man, dem o.g. Rechenbeispiel folgend, allerdings nur 64x64 Bildpunkte ab und benutzt einen Scantubus mit hoher Eigenfrequenz, so sind theoretisch zeitliche Auflösungen im Bereich von ~ 200 ms zu erreichen. Ungeachtet der hier aufgeführten Beispiele kristallisiert sich ein wichtiges Problem der Rastersondenmikroskopie heraus: Hohes zeitliches Auflösungsvermögen des Scanners erfordert die Reduktion der räumlichen Auflösung und umgekehrt sind hohe Bildpunktdichten nur bei relativ langer Abbildungsdauer realisierbar.

Die maximale Scannergeschwindigkeit (Zeilen/s) mit welcher der Scanner relativ zur Probenoberfläche bewegt wird, ist auch von der Größe des zu untersuchenden Oberflächenareals des Objektes abhängig. Beispiel: Rastert man einen 100µm<sup>2</sup> großen Bereiches mit einer Scanmatrix von 512x512 Bildpunkten, so liegen benachbarte Bildpunkte innerhalb dieses Rasters ~ 0,195 µm voneinander entfernt. Je kleiner das Scanareal, desto geringer ist die Schrittgröße und damit die Schwingungsamplitude des Piezos. Bei konstanter, piezomaterialabhängig begrenzter, maximaler Schwingungsenergie verhalten sich Amplitude und Frequenz umgekehrt proportional zueinander, so dass große Schwingungsamplituden nur bei relativ geringeren Frequenzen realisierbar sind und umgekehrt höhere Frequenzen nur bei relativ kleineren Amplituden erreicht werden. Für die Rastersonden-Mikroskopie bedeutet dies zusammenfassend: Je größer das Scanareal und die Bildpunktanzahl innerhalb der Scanmatrix, umso geringer ist die maximal erreichbare Scangeschwindigkeit. Reduktion der Bildpunktmatrix und der maximalen Scangröße ermöglichen höhere Scangeschwindigkeiten und damit eine Erhöhung des zeitlichen Auflösungsvermögens.

realisieren Translationsbewegungen in allen drei Raumebenen, wobei die maximal erreichbare Auslenkung von der Anordnung, der Geometrie (Länge, Durchmesser und Wanddicke) oder von Materialeigenschaften (piezoelektrischer Kopplungskoeffizient) der piezokeramischen Elemente abhängt und die erreichbare Stellgenauigkeit von  $\sim 1 \text{ pm}$  ( $0,01 \text{ \AA}$ ) keine Auflösungsbegrenzung darstellt. Die Bewegungen des Scanners in horizontaler Ebene (x-y-Ebene = Objektebene) wird durch einen computergesteuerten Hochspannungsgenerator erzeugt. Um ein definiert großes, horizontales Areal der Objektoberfläche abzurastern, muss zunächst festgelegt werden, welche x-y-Raumrichtung der „Schnellen-Scan-Richtung (fast-scan-direction)“ und welche der „Langsamen-Scan-Richtung (slow-scan-direction)“ entsprechen soll. Außerdem ist die Festlegung der Datenpunktmatrix notwendig. Ein rastersondenmikroskopisches Bild, welches mit einer Scanmatrix von  $100 \times 100$  Punkten generiert würde, bestünde aus 10.000 Bildpunkten, da an jeder x-y-Position des Scanners ein z-Messwert generiert wird. Üblicherweise werden Matrizen mit  $64 \times 64$ -,  $128 \times 128$ -,  $256 \times 256$ - oder  $512 \times 512$ - Punkten benutzt. Computergesteuert bewegt sich der Scanner entlang der ersten Bildpunktzeile des definierten Areals hin und zurück (schnelle Scanrichtung). Anschließend bewegt er sich rechtwinklig dazu (langsame Scanrichtung), um in die zweite Bildpunktzeile zu

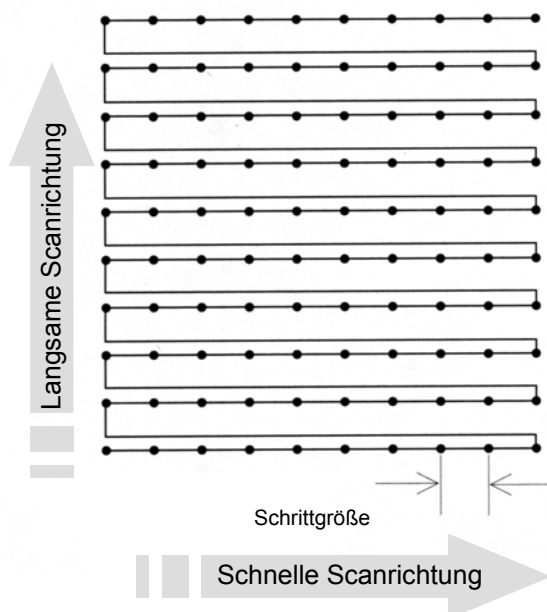


Abbildung 7 aus <sup>85</sup>

gelangen, fährt darauf hin und zurück, springt in die dritte Zeile und so weiter bis er die letzte Zeile des festgelegten Areals erreicht hat (siehe Abbildung 7).<sup>85</sup>

Die Entfernung benachbarter Punkte innerhalb dieser Matrix, welche das laterale Auflösungsvermögen des Scanners beschreibt, ist demnach von der Größe des zu untersuchenden Areals auf der Probenoberfläche und der gewählten Scanmatrix abhängig. Generiert man beispielsweise  $512 \times 512$  Bildpunkte einer Objektoberfläche von  $5 \mu\text{m}^2$  Größe, so ist die Entfernung benachbarter Punkte innerhalb der Scanmatrix (Schrittgröße des Scanners)  $9,7 \text{ nm}$ .

Bei  $0,5 \mu\text{m}^2$  großem x-y-Scanareal läge diese Schrittgröße des Scanners

bei  $\sim 1 \text{ nm}$ , also schon im Bereich atomarer Diameter. Diese Stellgenauigkeit des Piezos wird auch in vertikaler Richtung erreicht, womit eindeutig belegt ist, dass der piezokeramische Scanner das räumliche Auflösungsvermögen der Rastersondenmikroskope nicht limitiert.

#### 3.1.4.1.1 Der piezoelektrische Effekt

Die Geschwister Marie und Pierre Curie beschrieben als Erste, dass bei mechanischer Deformierung bestimmter Materialien (Piezokristalle) ableitbare elektrische Spannungen entstehen (direkter piezoelektrischer Effekt). Legt man an einen solchen piezokeramischen Körper eine elektrische Spannung  $U$  an, so

### 3.1.4.3 Nichtlineare Effekte

Reproduzierbare rastersondenmikroskopische Abbildungen sind mit hoher Präzision nur dann erzielbar, wenn die Scannermechanik zu jeder Zeit auf definierte Spannungswerte mit richtungs- und betragsmäßig konstanten Translationsbewegungen reagiert. Das o.g. Herstellungsverfahren piezokeramischer Scanner richtet die primär ungeordneten Dipolmomente des polykristallinen Piezomaterials zwar aus, ist aber nicht in der Lage, den so erreichten Polarisationszustand langfristig stabil zu konservieren. Dies bedeutet, dass Piezokeramiken im Laufe der Zeit zunehmend depolarisieren und damit ihre lineare Stellgenauigkeit (bis zu 10 % Abweichung) verlieren. Im folgenden werden einige Besonderheiten piezokeramischer Materialien und deren Einfluss auf die Linearität der Scanner näher erläutert, da jede rastersondenmikroskopische Abbildung hinsichtlich dieser Einflussfaktoren kritisch diskutiert werden sollte.

#### 3.1.4.3.1 Intrinsische Nonlinearität

Legt man an ein piezoelektrisches Material schrittweise linear gesteigerte, gerichtete Spannungen an, so sollte die Auslenkung des Materials linearfunktionell von dieser Spannung abhängig sein. In der Realität

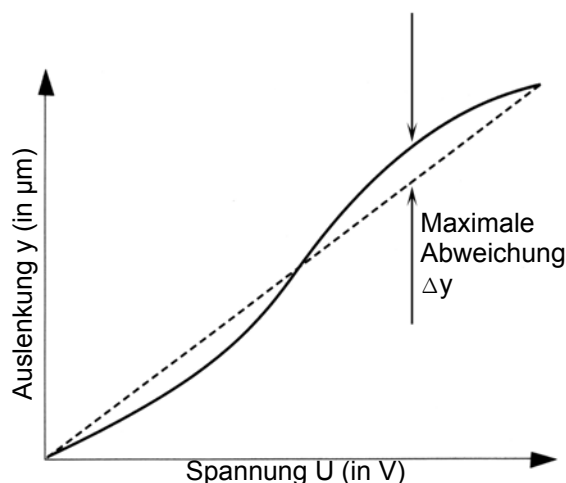


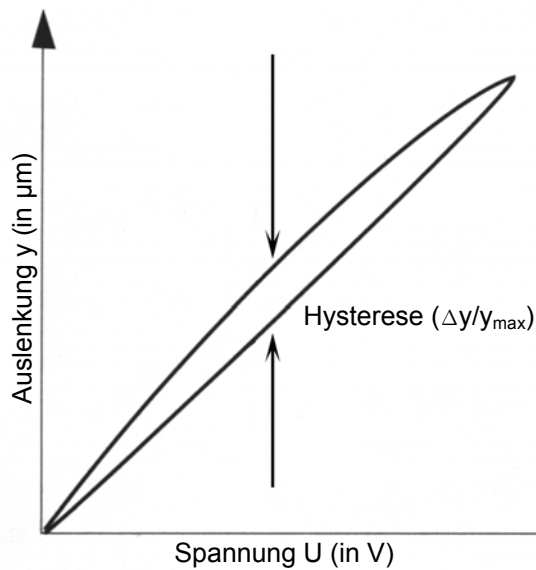
Abbildung 9 modifiziert nach <sup>85</sup>

findet man in Abhängigkeit vom verwendeten Material eine s-förmige Kurvenabweichung von der Linearfunktion. Das Verhältnis der maximalen Abweichung der Kurve ( $\Delta y$ ) von der linearen Idealkurve ( $y$ ) an einer bestimmten Spannung ( $U$ ) bezeichnet man als intrinsische Nonlinearität ( $\Delta y/y$ ) des Scanners. (Abbildung 9)

Die in den Mikroskopen implementierten Scanner weisen intrinsische Nonlinearitäten im Bereich zwischen 2 % bis 10 % auf. Selbstredend beeinflusst dieses Phänomen sowohl die horizontalen als auch die vertikalen Scannerbewegungen und folglich die Genauigkeit der Längen- und Höhenmessung an den rasterkraftmikroskopisch zu untersuchenden Objektoberflächen.

#### 3.1.4.3.2 Hysterese

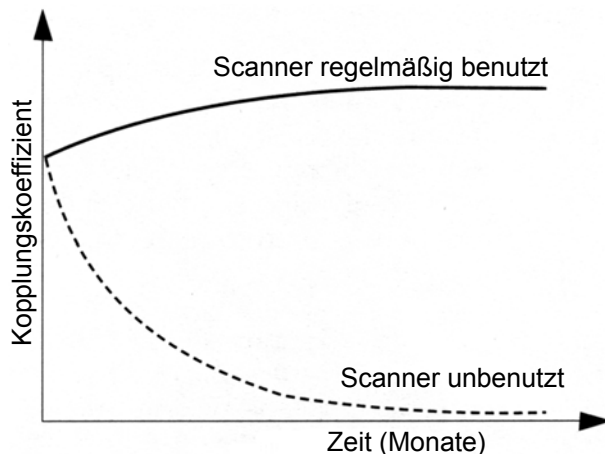
Ein weiteres Charakteristikum wird als Hysterese bezeichnet und beschreibt das unterschiedliche Auslenkungsverhalten piezoelektrischer Materialien auf entgegengesetzt gerichtete Spannungen gleichen Betrages. Steigert man die, an ein Piezoelement angelegte Spannung von 0 Volt beginnend graduell bis zu einem bestimmten Wert, so erzeugt das Element eine gerichtete Bewegung (Auslenkung), wobei jeder einzelne Spannungswert eine definierte Auslenkung des Piezos generiert. Legt man nun eine entgegengesetzt gerichtete Spannung gleichen

Abbildung 10 modifiziert nach <sup>85</sup>

Betrages und gleichartiger gradueller Abstufung an den expandierten Scanner an, so müsste im Idealfall die induzierte Retraktionsbewegung durch die selben Spannungsbeträge beschrieben werden wie bei der Expansionsbewegung des Scanners. Dieser Idealfall ist aufgrund hysteretischer Eigenschaften der Piezos nicht zu erreichen. Das bedeutet, dass der Scanner bei Expansions- und Retraktionsbewegungen unterschiedliche Spannungen benötigt, um gleiche Auslenkung zu erfahren. Als Hysterese wird die maximale Divergenz der Auslenkung zwischen beiden Bewegungsrichtungen im Verhältnis zur maximal erreichten Scannerauslenkung bezeichnet (Abbildung 10). Hysterese

bedeutet für die mikroskopische Abbildung, dass in der x-y-Ebene eines Objektes topografische Längenabweichungen zwischen Hin- und Rückbewegung des Scanners auftreten und in der vertikalen Richtung topografische Erhebungen und Vertiefungen gleichen Betrages unterschiedlich hoch bzw. tief wiedergegeben werden. Demzufolge ist für die Begutachtung rastersondenmikroskopischer Bilder die Berücksichtigung dieses typischen Phänomens piezoelektrischer Materialien essentiell.

#### 3.1.4.3.3 Alterungsprozesse ("Aging")

Abbildung 11 modifiziert nach <sup>85</sup>

Die Anzahl der achsenausgerichteten Dipolmomente innerhalb der polykristallinen Piezostruktur bestimmt das Ausmaß der möglichen Translationsbewegung. Naturbedingt verliert ein Teil der Monokristalle die herstellungstechnologisch erzwungene Achsenausrichtung. Je größer die Anzahl der ausgerichteten Dipolmomente im Scanner ist, desto größer ist die Translationsbewegung die ein Scanner nach Anlage einer definierten Spannung vollziehen kann. Dies wird indirekt durch den Kopplungskoeffizienten ( $k$ ) beschrieben. Dieser Koeffizient vermindert sich

im Laufe der Zeit exponentiell, wenn der Scanner nicht regelmäßig benutzt wird. Die Alterungsrate von Scannern ist durch die Änderung des piezoelektrischen Kopplungskoeffizienten ( $\Delta K$ ) in einem bestimmten Zeitintervall ( $\Delta t$ ) definierbar. Regelmäßige Benutzung der Scanner führt zur Reorientierung der zufällig ausgerichteten Dipolmomente und reduziert dadurch die Alterungsrate.

### 3.1.4.3.4 Elektrisches „Creeping“

Wenn auf den Scanner abrupte Spannungsänderungen einwirken, so vollzieht sich die gerichtete Auslenkungsbewegung in zwei Phasen (Abbildung 12). Während der

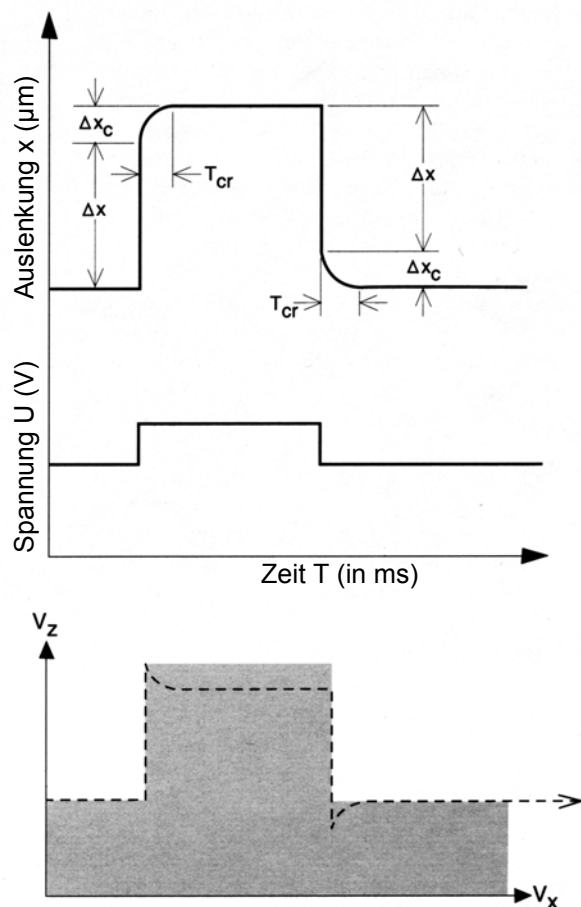


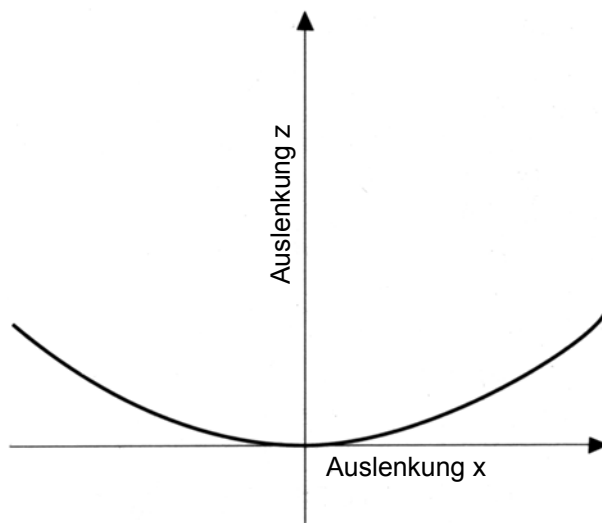
Abbildung 12 modifiziert nach <sup>85</sup>

ersten Phase, die weniger als 1 ms dauert, realisiert der Scanner den größten Teil der dimensionellen Veränderungen ( $\Delta x$ ). Die der Spannung entsprechenden Endauslenkung ( $\Delta x + \Delta x_c$ ) wird erst nach einer zweiten Bewegungsphase, welche deutlich länger dauert als die erste, erreicht. Das prozentuale Verhältnis der Konformationsänderungen des Scanners während dieser beiden Phasen wird als „Creep“ bezeichnet. Zur genaueren Quantifizierung dieses Parameters wird zusätzlich das Zeitintervall ( $T_{cr}$ ) vom Beginn der konformationellen Änderung bis zum Erreichen der spannungsabhängigen Endauslenkung des Piezos angegeben. Die Auswirkungen auf die mikroskopische Abbildung ist schematisch im unteren Schema der Abbildung 12 veranschaulicht. Der grau unterlegte Bereich schematisiert die realen Höhenverhältnisse einer Objektoberfläche ( $V_z$ ) entlang einer Scanlinie ( $V_x$ ), die perforierte Linie dokumentiert die falsch detektierte Oberflächentopografie.

### 3.1.4.3.5 Thermische Drift

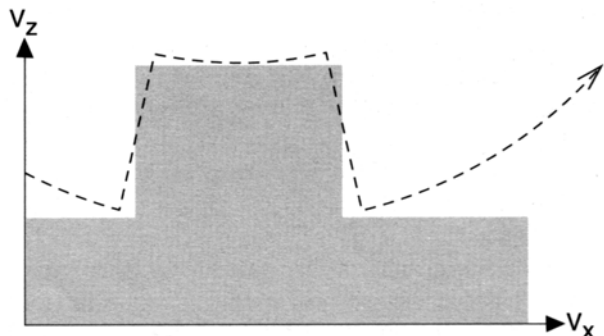
Thermische Einflüsse verändern die Entropie der Dipolmomente innerhalb eines piezoelektrischen Materials. Erwärmung der Materialien führt zu größeren Schwingungen der Monokristalle und ihrer Dipolmomente innerhalb des polykristallinen Piezomaterials, wodurch konsekutiv weniger linear ausgerichtete Dipolmomente für gerichtete Translationsbewegungen zur Verfügung stehen. Insbesondere bei Untersuchung temperierter Objekte (z.B. Oberflächen von Zellen in physiologisch temperierten Zellmedien) muss demzufolge eine gute thermische Isolation zwischen Scanner und Probenhalter gewährleistet sein, um temperaturabhängige Nonlinearitäten nicht zu akzentuieren. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten rasterkraftmikroskopischen Untersuchungen an vitalen Zellen wurden bei zellphysiologischen Umgebungsbedingungen durchgeführt. Daher war es nötig, den auf dem Scanner-Tubus befestigten Probenhalter zu temperieren ( $37^\circ\text{C}$ ). Hierfür wurde eine speziell konstruierte und thermisch gegen den Scannertubus isolierte Temperiereinrichtung eingesetzt. Details dieser Temperiereinrichtung sind unter 3.1.6.3 beschrieben.

### 3.1.4.3.6 Kreuzkopplung

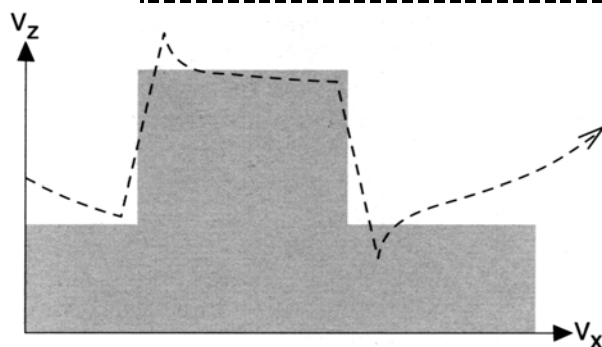
Abbildung 13 modifiziert nach <sup>85</sup>

Mit dem Begriff "Cross coupling" beschreibt man das Phänomen, dass jede Scannerbewegung in Richtung der x-Achse oder in Richtung der y-Achse immer mit einer geringen Bewegungskomponente in Richtung z-Achse verbunden ist (Abbildung 13). Die Ursachen dafür sind von sehr komplexer Natur. Hauptsächlich wird es durch die geometrische Anordnung der Piezoelemente hervorgerufen. Die meisten Scanelemente moderner Rastersonden-Mikroskope bestehen aus 4-Segment-Röhren (slotted-tube-design; s.o.). Um x-y-Bewegungen zu vollziehen, kontrahiert eines der 4 Röhrenviertel, wobei sich

das gegenüberliegende Segment ausdehnt. Demzufolge ist die resultierende horizontale Bewegung des Scanners nicht hundertprozentig achsenparallel, sondern leicht sphärisch ausgerichtet. Diese ungewollte vertikale Bewegung während der x-y-Translation beeinflusst die rastersondenmikroskopische Abbildung in der Form, dass absolut plane Objektoberflächen „schüsselförmig“ abgebildet werden. Dieser piezobedingte Abbildungsfehler wird in Abbildung 14 schematisch verdeutlicht. Eine stufenförmige Struktur die entlang der horizontalen x-Achse des Objektes abgebildet wird, erscheint im rastersondenmikroskopisch detektierten Höhenprofil konkav gewölbt (perforierte Linie). Derartige Verzerrungen der realen topografischen Information der rastersondenmikroskopisch zu untersuchenden Oberflächen sind durch entsprechende Kalibrierungsmaßnahmen und spezielle Hardware-Korrektursysteme deutlich reduzierbar, aber nicht vollständig eliminierbar, so dass dieser Parameter bei der kritischen Auswertung von AFM-Bildern unbedingt zu berücksichtigen ist.

Abbildung 14 aus <sup>85</sup>

### 3.1.4.3.7 Kombiniertes Einfluss aller Nonlinearitätseffekte

Abbildung 15 aus <sup>85</sup>

Die wichtigsten Nonlinearitätsparameter des Scanners und deren Einfluss auf die rastersondenmikroskopische Abbildung sind in den vorangehenden Abschnitten beschrieben. Für die Begutachtung und kritische Diskussion rastersondenmikroskopischer Abbildungen ist die Kenntnis einzelner piezoassoziierter Fehlereinflüsse essentiell. Allerdings

muss man sich darüber im Klaren sein, dass die Kombination aller genannten Nonlinearitätseffekte mit der Abbildung interferiert und eine komplexe Fehlerdiskussion dadurch deutlich erschwert wird. Um diese Problematik zu verdeutlichen, ist die Kombination von Hysterese, Creep und Kreuzkopplung und deren Abbildungseinfluss in Abbildung 15 schematisiert.

#### 3.1.4.3.8 Korrekturmöglichkeiten

Unkorrigierte Nonlinearitätseffekte erzeugen bis zu 15 %-ige Abweichungen von der realen Oberflächentopografie bei rasterkraftmikroskopischen Untersuchungen. Im Sinne maximaler Abbildungspräzision ist deshalb die Detektion und bestmögliche Korrektur dieser Effekte essentiell. Korrekturen sind möglich, indem man die

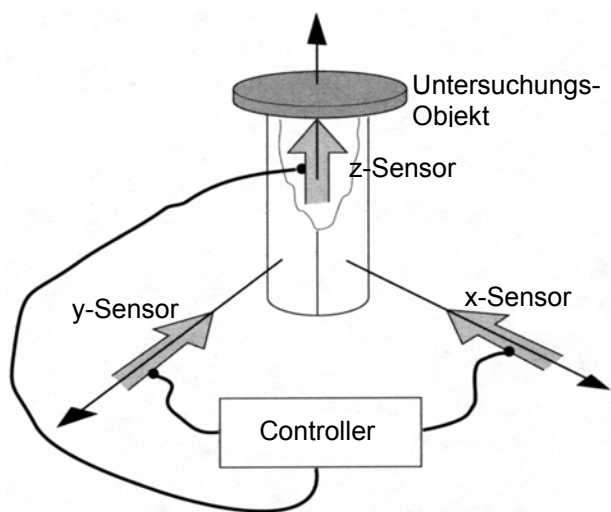


Abbildung 16 modifiziert nach <sup>85</sup>

Nonlinearitäten des piezokeramischen Materials direkt am Scanner mittels spezieller Sensoren permanent detektiert und fehlerhafte, nichtlineare Bewegungsabläufe durch zusätzlich applizierte Korrekturspannungen ausgleicht. Dabei wird jede Bewegungsebene durch einen, am Scannertubus installierten Sensor kontrolliert. (Abbildung 16) Am meisten verbreitet sind optische-, kapazitive- oder Dehnungstreifensensoren. Optische Sensoren funktionieren wie die oben beschriebenen positions-sensitiven Photodioden. Die Dehnungstreifensensoren bestehen ebenfalls aus piezokeramischem Mate-

rial und sind aus meiner Sicht nicht geeignet, um Nonlinearitäten piezokeramischer Materialien genau zu detektieren. Kapazitive Sensoren messen die bewegungsabhängige Kapazitätsänderung zwischen zwei Metallelektroden. Eine dieser Elektroden ist dabei am Scannertubus, die andere stationär in deren Nähe befestigt. Die Orientierung der Sensorikhardware erfolgt im Rahmen eines speziellen Kalibriervorganges, der im folgenden Kapitel beschrieben wird.

#### 3.1.4.4 Kalibrierung

Um zu gewährleisten, dass der Scanner auf definierte Spannungswerte mit präzisen linearen Translationsbewegungen reagiert, ist die regelmäßige Kalibrierung des Scanners und der beschriebenen Nonlinearitätssensoren unerlässlich. Hierzu bedient man sich bestimmter, zumeist kristalliner Kalibrierstandards, deren Struktur genau definiert ist. Neben der Notwendigkeit jede Scannerbewegungsrichtung separat zu eichen, ist es wichtig, die Größe der Kalibrierstruktur größenordnungsmäßig der zu untersuchenden Objektstruktur anzupassen. Untersucht man kleine Oberflächenareale von beispielsweise  $1\mu\text{m}^2$  bis  $5\mu\text{m}^2$  Größe, so sollten die eingesetzten Kalibrierstrukturen ebenfalls zwischen 1 und 5  $\mu\text{m}$  groß sein. Im Rahmen unserer Untersuchungen wurden zwei verschiedene Scannertuben eingesetzt, die selbstverständlich unabhängig voneinander einzeln kalibriert werden



mussten. Hierfür wurden spezielle, im folgenden beschriebene Kalibrierstandards benutzt.

#### 3.1.4.4.1 Kalibrierstandards

Typischerweise benutzt man für die Kalibrierung der horizontalen Bewegungsebene des Scanners periodisch aufgebaute Kristallgitter. Für größere Scanbereiche wurde ein Gitter mit 10  $\mu\text{m}$ - Periodenabstand, für kleinere Scanbereiche ein 1  $\mu\text{m}$ -periodisches Gitter benutzt. Beide Standards gehören zum Lieferumfang des Autoprobe CP der Firma Park Scientific Instruments. Rastert man während des Kalibriervorganges eine definiert große Objektoberfläche ab, so muss nach Kalibrierung der bekannte Abstand der periodischen Gitterstrukturen mit dem abgebildeten Gitterstrukturabstand genau übereinstimmen. Der Quotient aus bekannten Werten und gemessenen Werten ergibt den Kalibrierungskoeffizienten, der zur Spannungsabstimmung benutzt wird. Im abgebildeten Beispiel wurde ein

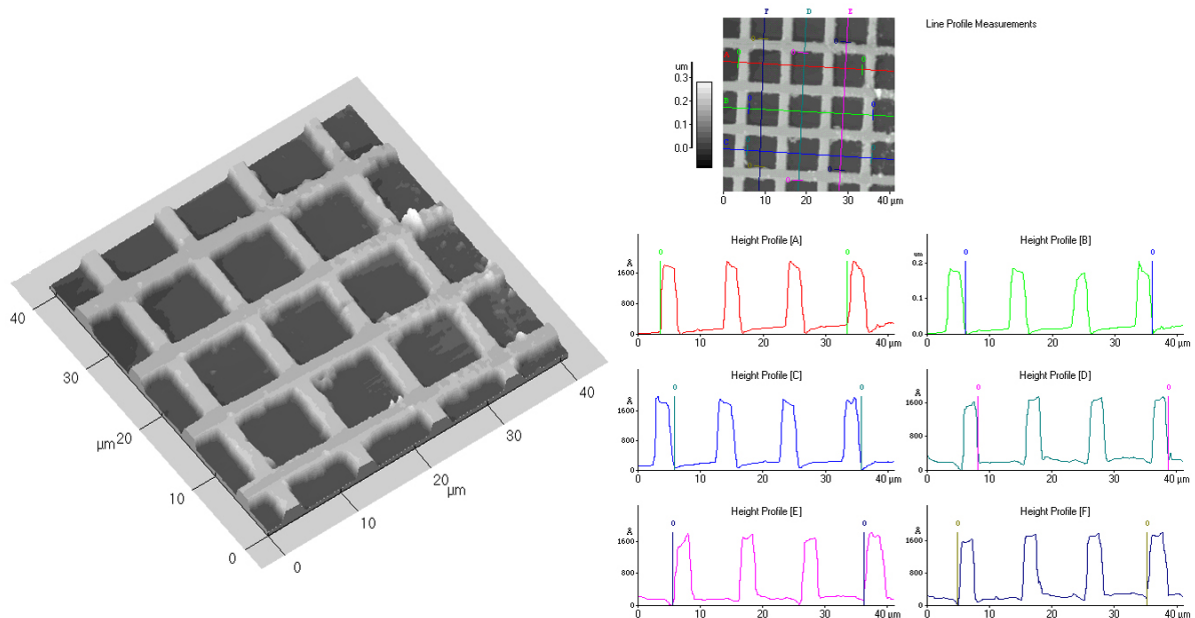


Abbildung 17

Kalibrierungsgitter abgebildet, bei welchem der Abstand der Gitterstrukturen 10  $\mu\text{m}$  beträgt. Die abgebildete Fläche ist 42  $\mu\text{m}^2$  groß. Misst man parallel zu den Gitterstrukturen den Periodenabstand von 3 aufeinanderfolgenden Strukturen ( $3 \times 10 \mu\text{m} = 30 \mu\text{m}$ ), so erhält man über mehrere Messungen gemittelt einen Abstand von 30,3  $\mu\text{m}$ . Das mikroskopische Bild erfasst die Gitterstrukturen also dimensionell größer als sie real sind. Demzufolge muss die piezotreibende Steuerspannung betragsmäßig minimal reduziert werden, damit danach gemessene und reale Dimensionen übereinstimmen. Da Auslenkung des Piezos und treibende Spannung linear voneinander abhängen, wird der Betrag der Steuerspannung mit dem errechneten Kalibrierungskoeffizienten multipliziert, um die korrigierte Steuerspannung zu ermitteln. Dieses Procedere wird für jede Bewegungsebene des Scanners vollzogen, wobei für die vertikale Ebene ein Silizium-Siliziumoxid-Kalibrierstandard mit definierten Höhenstufen (Schichtdickennormal der Physikalisch



Abbildung 18

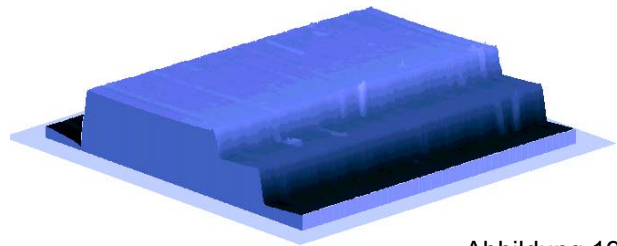


Abbildung 19

Technischen Bundesanstalt) zur Anwendung kommt. (Abbildungen 18, 19) Auf Mica präparierte 200 nm- Polystyrol- Kügelchen (Nanospheres™) sind als Kalibriersubstrat für alle Scannerbewegungen geeignet<sup>86</sup>, aber für den Routinebetrieb nicht zu empfehlen, da deren Herstellung erheblichen präparatorischen Aufwand erfordert.

### 3.1.5 AFM-Cantilever und Tips

Die Schlüsselkomponente des Rasterkraftmikroskops ist der Cantilever mit dem, an dessen Spitze lokalisierten Messtip. Die detektierten Wechselwirkungskräfte im Nahfeld von Objektoberflächen werden durch die spezielle Anordnung des Messtips

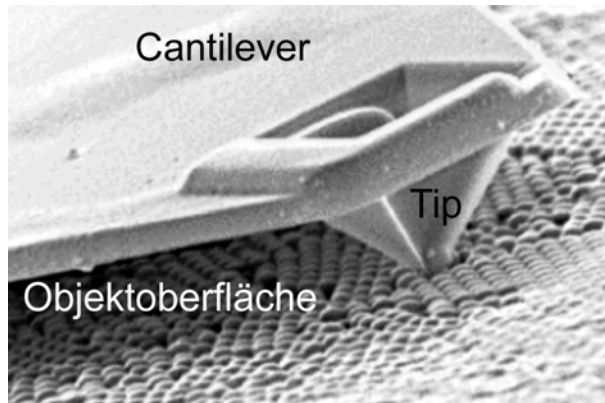


Abbildung 20

am Cantilever direkt auf diesen übertragen. (Abbildung 20 - SEM-Aufnahme eines Cantilevers) Demnach darf die Federkraft des Cantilevers nur so groß sein, dass Kräfte im Pikonewtonbereich bereits zu einer vertikalen Auslenkung der Federgabel (Cantilever) führen. Sowohl die Konfiguration des Cantilevers, als auch die Morphologie des Messtips beeinflussen die Qualität der rasterkraftmikroskopischen Abbildung entscheidend. In der Praxis haben sich verschiedene

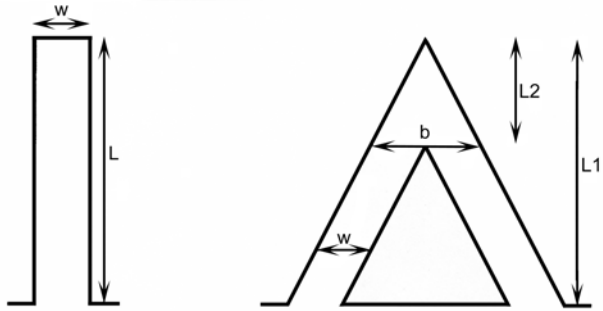
Designs der Cantilever und Messtips etabliert. Die gebräuchlichsten und im Rahmen dieser Arbeit zur Anwendung gekommenen Komponenten werden im folgenden beschrieben

#### 3.1.5.1 Cantilever modifiziert nach 87

An den tiptragenden Cantilever werden in praxi folgende Anforderungen gestellt:

- Seine Federkraft muss kleiner sein als die zu detektierende interatomare Wechselwirkungskraft,
- die Resonanzfrequenz muss sehr hoch sein, um mit maximaler Geschwindigkeit auf Veränderungen der Oberflächentopografie reagieren zu können und
- seine Grundgeometrie muss den Erfordernissen der rasterkraftmikroskopischen Untersuchung genügen.

Diesen Ansprüchen gerecht werdend, haben sich zwei verschiedene Cantilever-Designs durchgesetzt. Der Balkencantilever erfüllt die o.g. Kriterien, hat sehr geringe Federkonstanten und relativ hohe Resonanzfrequenzen. Die Besonderheit dieses Cantilevers besteht darin, dass er sich bei der Bewegung über die Objektoberfläche

Abbildung 21 aus <sup>87</sup>

sehr leicht entlang seiner Längsachse verwindet. Möchte man laterale Kräfteinflüsse detektieren (z.B. Reibungskräfte zwischen Objekt und Tip), ist dieser Cantilever hervorragend geeignet. Oberflächentopografisch orientierte Untersuchungen werden durch diese Verwindungskomponente der Balkencantilever artifiziell überlagert, so dass für diese Anwendung vorwiegend Dreieckscantilever eingesetzt werden.

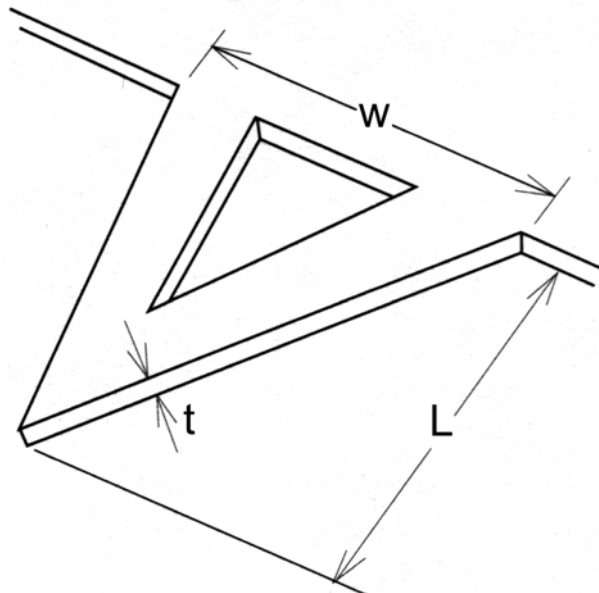
Federkonstanten, Resonanzfrequenz und Verwindungsstabilität sind durch Cantilevermaterial- und Geometrie direkt beeinflussbar. Die geometrische Konfiguration und deren Einfluss auf die Federkonstante ( $k$ ) der Cantilever ist nebenstehend dargestellt.  $E$  bezeichnet hierbei einen speziellen materialabhängigen Elastizitätskoeffizienten, der "Young's Modulus" genannt wird. Am Balkencantilever gilt:

$$k = \frac{Et^3w}{4L^3} \quad .$$

Die Federkonstante der Dreieckscantilever wird nach folgender Formel berechnet:

$$k = \frac{Et^3wb}{2b(L_1^3 - L_2^3) + 6wL_2^3} \quad ,$$

wobei  $t$  in beiden Formeln die Dicke des Cantilevers beschreibt (siehe Abbildung 21). Außerdem gilt, dass steifere Cantilever (große Federkonstante) höhere Eigenresonanzfrequenzen aufweisen als sehr weiche Cantilever. Die Eigenresonanzfrequenz spielt besonders für den, an biologischen Objekte sehr geeigneten Tapping-Mode (siehe unten) eine entscheidende Rolle. Die Auswahl des optimalen Cantilevers für die spezielle AFM-Untersuchung ist also von folgenden Fragestellungen abhängig:

Abbildung 22 aus <sup>85</sup>

Die Auswahl des optimalen Cantilevers für die spezielle AFM-Untersuchung ist also von folgenden Fragestellungen abhängig:

- Sollen weiche (biologische) oder harte (amorphe oder kristalline) Oberflächen untersucht werden?
- Welcher AFM-Modus (Contact-, Non-Contact-, Tapping-Mode) ist für die Untersuchung des speziellen Objektes der optimale?
- Welche zeitliche oder räumliche Auflösung ist erforderlich?
- Erfolgt die Abbildung des Objektes unter Vakuum- oder Raumbedingungen oder in wässrigen Lösungen?

Auch hierbei wird der, für das entsprechende mikroskopische Experiment optimale Cantilever vom Anwender empirisch ermittelt. Die entsprechende experimentelle Anordnung und Auswahl der mikroskopischen Komponenten wird im Ergebnisteil detailliert beschrieben und begründet.

### 3.1.5.2 AFM-Spitzen (Tips) modifiziert nach 87

Das laterale Auflösungsvermögen des AFM ist durch die Schrittweite des Scanners (siehe dort) und durch den Tipradius ( $R$ ) determiniert. Der Tipradius wird entscheidend durch die Herstellung der Silizium- bzw. Siliziumnitrid-Tips beeinflusst. Abhängig von Herstellungsprocedere unterscheidet man prinzipiell 2 Typen von

AFM-Spitzen: pyramidale und konoidale. Je geringer der Radius dieser Spitzen, desto besser ist das laterale Auflösungsvermögen des Rasterkraftmikroskops.

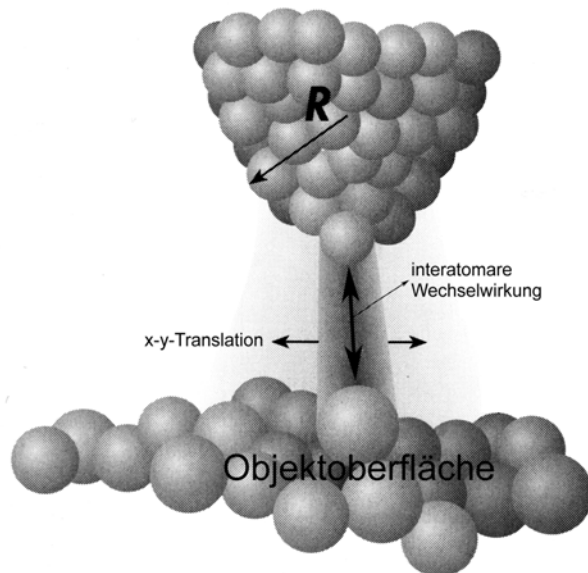


Abbildung 23 modifiziert nach <sup>84</sup>

#### 3.1.5.2.1 Pyramidale AFM-Tips

Ein Siliziumkristall wird mit Kaliumhydroxid chemisch geätzt. Das Kaliumhydroxid hat die Eigenschaft in einem Silizium-110-Kristall eine definierte Anzahl von 110 Siliziumschichten zu ätzen. Durch die Größe des Areals auf dem Siliziumkristall, welches mit KOH behandelt wird, definiert man die Größe der Grundfläche des pyramidalen Tips. Dringt das Ätzagens in die Tiefe des Siliziumkristalls ein, entsteht ein pyramidaler Substanzverlust mit definierter Grundfläche und definierter Tiefe (110 atomare Schichten)(1). Anschließend wird durch LPCVD-Technik (low-pressure chemical vapor deposition) auf der Siliziumoberfläche ein Siliziumnitrid ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ )-Film aufgedampft (2). Hierbei bildet die zuvor geätzte pyramidale Vertiefung in der Siliziumoberfläche die Matrice für den entstehenden Silizium-Nitrid-Tip. Photolithografisch wird dann aus der Siliziumnitridoberfläche die gewünschte Cantileverform ausgeschnitten und ein Glassubstrat anodisch gebunden (3), was später die Cantilever-Tip-Einheit trägt (4). Die Dicke des Cantilevers ist von der Anzahl der aufgedampften Siliziumnitridschichten abhängig. Der für die resultierende pyramidale Tipform relevante Herstellungsschritt ist das Ätzen der

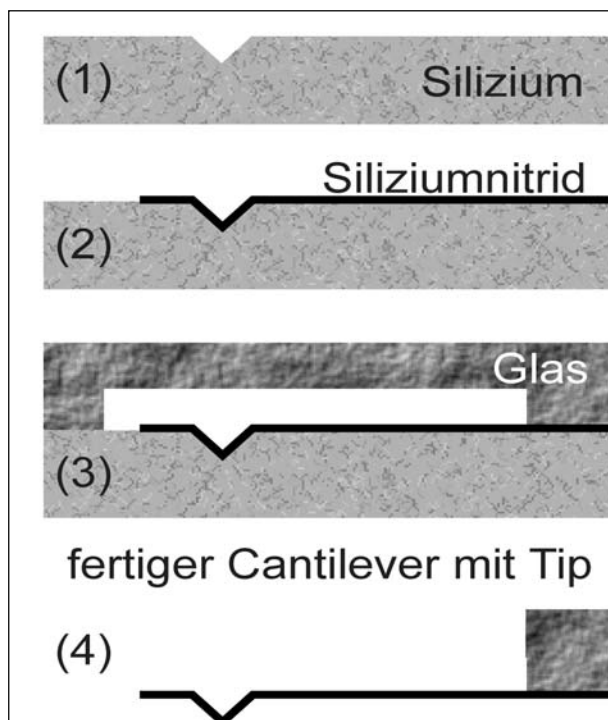


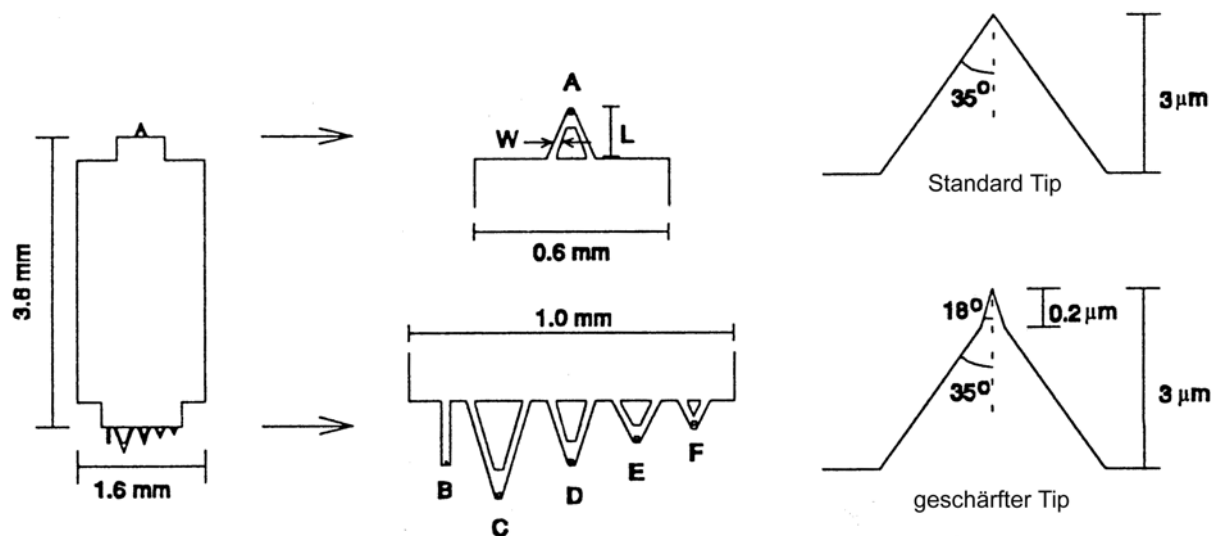
Abbildung 24

Tipmatrice, da die Form der Pyramide nur durch deren Grundfläche determiniert wird und in dieser Form hergestellte pyramidale Tips immer eine Höhe von 110 atomaren Siliziumschichten aufweisen. Die im Rahmen dieser Arbeit zur Anwendung

gekommenen Cantilever-Tip-Einheiten mit pyramidalen Tipform (Microlever® der Firma Park Scientific Instruments) weisen folgende Charakteristika auf.

Typ	L ( $\mu\text{m}$ )	W ( $\mu\text{m}$ )	Dicke ( $\mu\text{m}$ )			Federkonstante (N/m)			Resonanzfrequenz (kHz)		
			min.	typ.	max.	min.	typ.	max.	min.	typ.	max.
A	100	13	0,5	<b>0,6</b>	0,7	0,03	<b>0,05</b>	0,08	18	<b>22</b>	26
B	100	22	0,5	<b>0,6</b>	0,7	0,01	<b>0,02</b>	0,03	12	<b>15</b>	18
C	100	13	0,5	<b>0,6</b>	0,7	0,006	<b>0,01</b>	0,015	6	<b>7</b>	8
D	100	22	0,5	<b>0,6</b>	0,7	0,02	<b>0,03</b>	0,05	12	<b>15</b>	18
E	200	18	0,5	<b>0,6</b>	0,7	0,06	<b>0,1</b>	0,15	32	<b>38</b>	44
F	200	36	0,5	<b>0,6</b>	0,7	0,3	<b>0,5</b>	0,8	100	<b>120</b>	140

Tabelle 1

Abbildung 25 aus <sup>82</sup>

Elektronenmikroskopische Bilder dieser Cantilever-Tip-Elemente zeigt Abbildung 26.

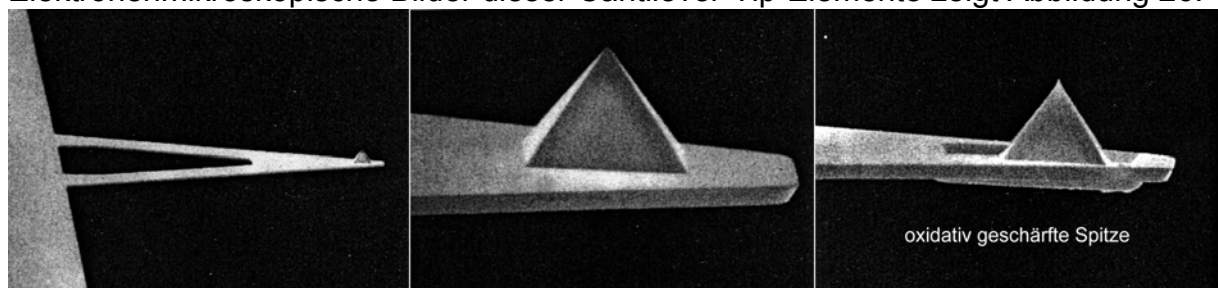


Abbildung 26

### 3.1.5.2.2 Konoidale AFM-Tips

Diese Cantilever-Tip-Einheiten bestehen fabriktionsbedingt nicht aus Siliziumnitrid sondern aus reinem Silizium. Auf einer Siliziumoberfläche wird ein rundes Siliziumdioxid-Areal definierter Größe aufgebracht. Der anschließende Trockenätzprozess mit speziellen Ätzgasen greift das Siliziumdioxid nicht an, wohl aber das Silizium selbst. Die Zusammensetzung des Ätzgases determiniert das Verhältnis zwischen vertikaler und lateraler Dimension des Ätzvorganges und folglich die Form des entstehenden Messtips. Der nach diesem Ätzschritt auf der Spitze der

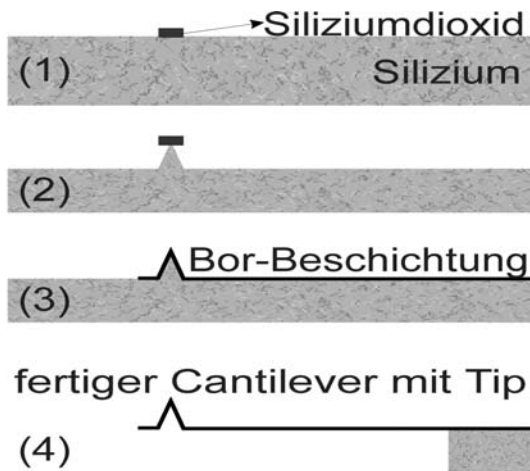
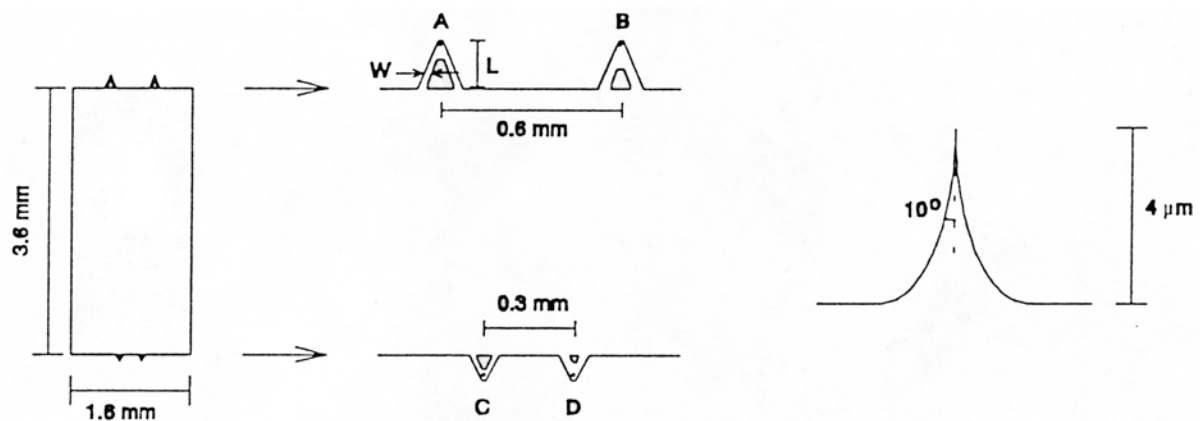


Abbildung 27

Siliziummatrix verbleibende Siliziumdioxid-Rest wird durch Oxydation entfernt und die Oberfläche dieser Matrix mit Bor versetzt, so dass die oberen Silizium Schichten durch den nachfolgenden Ätzprozess nicht mehr angegriffen werden. Schematisch ist dieser Herstellungsprozess in Abbildung 27 verdeutlicht. Die im Rahmen dieser Arbeit zur Anwendung gekommenen Cantilever-Tip-Einheiten mit konoidaler Tipform (Ultralever© der Firma Park Scientific Instruments) weisen folgende Charakteristika auf.

Typ	L ( $\mu\text{m}$ )	W ( $\mu\text{m}$ )	Dicke ( $\mu\text{m}$ )			Federkonstante (N/m)			Resonanzfrequenz (kHz)		
			min.	typ.	max.	Min.	typ.	max.	min.	typ.	max.
A	180	25	0,6	<b>0,8</b>	1,0	0,07	<b>0,16</b>	0,31	19	<b>25</b>	31
B	180	38	0,6	<b>0,8</b>	1,0	0,10	<b>0,24</b>	0,47	23	<b>30</b>	37
C	85	18	0,6	<b>0,8</b>	1,0	0,5	<b>1,1</b>	2,1	105	<b>140</b>	175
D	85	28	0,6	<b>0,8</b>	1,0	0,7	<b>1,6</b>	3,1	130	<b>170</b>	210
A	180	25	1,6	<b>1,8</b>	2,0	1,3	<b>1,9</b>	2,6	47	<b>53</b>	59
B	180	38	1,6	<b>1,8</b>	2,0	2,0	<b>2,8</b>	3,8	57	<b>64</b>	71
C	85	18	1,6	<b>1,8</b>	2,0	9,0	<b>13,0</b>	18,0	270	<b>300</b>	330
D	85	28	1,6	<b>1,8</b>	2,0	13,0	<b>18,0</b>	25,0	320	<b>360</b>	400

Tabelle 2

Abbildung 28 aus <sup>82</sup>

Elektronenmikroskopische Bilder dieser Cantilever-Tip-Elemente zeigt Abbildung 29.

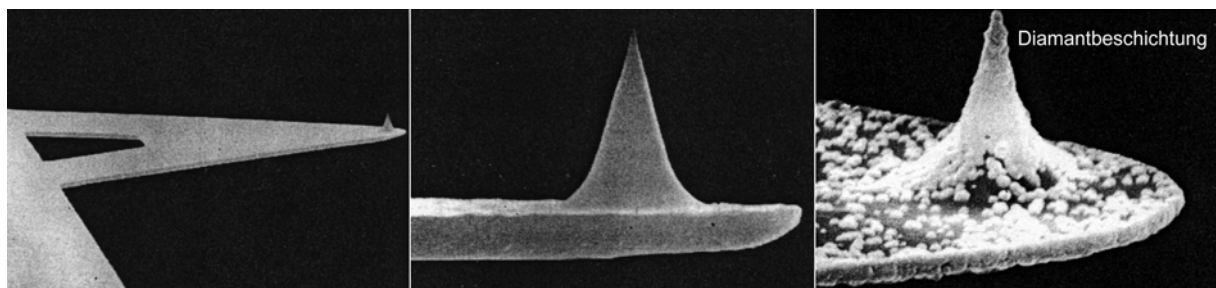


Abbildung 29



### 3.1.5.2.3 Kontrollstandard zur Evaluierung der Tipgeometrie

Im Idealfall sind die, mittels der o.b. Herstellungsprozesse gefertigten Messspitzen konoidal bzw. pyramidal konfiguriert, atomar spitz und weisen keine Doppelgeometrien auf. Die praktische Erfahrung zeigt jedoch, dass die Messtips nicht alle uniform und normiert sind, sondern dass in Abhängigkeit von der Herstellungscharge, der Lagerung und der Messumgebung (z.B. Elektrolyt) z.T. erhebliche Veränderungen der Spitzengeometrie auftreten können, die ihrerseits den Abbildungsprozess massiv beeinflussen. Aus diesem Grund gehörte es zum routinemäßigen Setup, alle Messspitzen unmittelbar vor deren experimentellem Einsatz hinsichtlich ihrer Spitzengeometrie zu evaluieren. Dazu wurde ein speziell gefertigter Siliziumwafer, welcher hierfür optimierte, geometrische Eigenschaften aufweist, eingesetzt:

- ca. 300 Å dicke Siliziumschicht
- Gesamtgrundfläche ca. 0,5 x 0,5 cm
- Inverse, gleichseitige Pyramiden mit quadratischer Grundfläche ( $0,1 \mu\text{m}^2$ ) sind im regelmäßigen Abstand von  $0,1 \mu\text{m}$  in diese Siliziumschicht eingätzt, so dass die Grundflächen dieser Pyramiden nach oben gerichtet und die Pyramidenspitzen in den Wafer hineingerichtet sind (siehe Abbildung)

Diese besondere Geometrie des Kalibrierwafers ermöglicht es appositionelle Verunreinigungen oder herstellungstechnisch bedingte Abweichungen von der Idealgeometrie der Messtips zu detektieren, da die Größe der abzubildenden Kalibrierstandards (inverse Pyramiden) im Größenbereich der zu evaluierenden Messtips liegt. Die folgenden Abbildungen zeigen auf der einen Seite die Abbildung des Kalibriegitters mittels eines ideal konfigurierten Messtips und auf der anderen Seite das, mittels einer verunreinigten, oder herstellungs- bzw. lagerungstechnisch alterierten Messspitze generierte Bild des Kalibrierstandards.

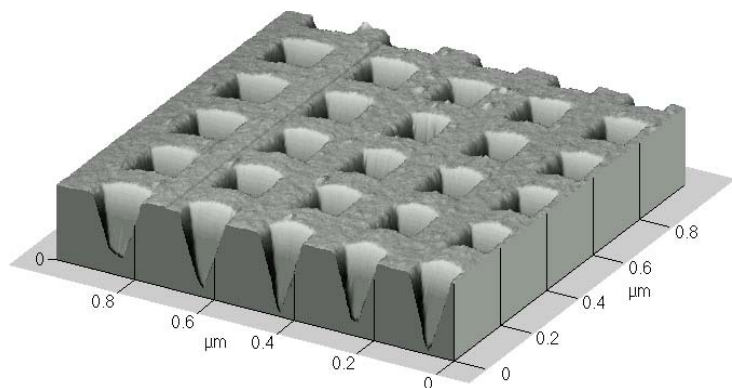
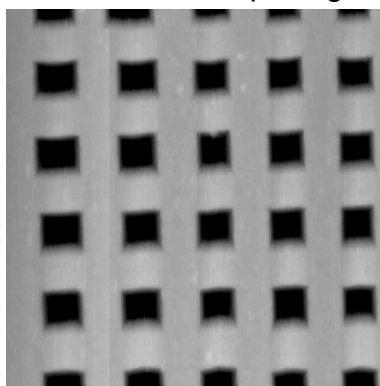


Abbildung 30  
Idealer Messtip

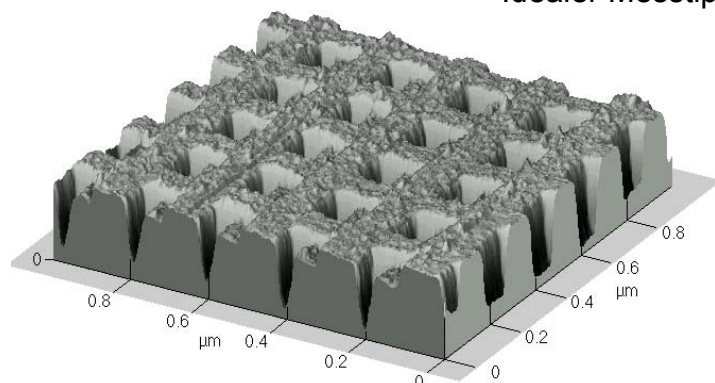
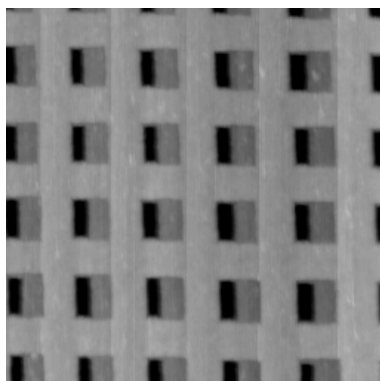


Abbildung 31  
Messtip mit Doppelspitze (appositionelle Verunreinigung oder Herstellungsdefekt)

### 3.1.6 AFM-Messumgebungen

Prinzipiell ist heutzutage die rasterkraftmikroskopische Abbildung in verschiedenen Messumgebungen möglich. Die Rastertunnelmikroskopie (STM) erfordert Vakuumbedingungen, weshalb die ersten AFM-Untersuchungen auch unter diesen Messbedingungen durchgeführt wurden. Viele unerwünschte Interaktionskräfte (z.B. adhäsive Meniskuskräfte) sind im Vakuum nicht vorhanden, was die hochauflösende Abbildung von Strukturen erleichtert. Biologische Proben sind mittels AFM im Vakuum nach elektronenmikroskopischen Präparationen (z.B. Gefriersubstitution)<sup>88</sup> sehr gut darstellbar. Allerdings besteht einer der wesentlichen Vorteile der Rasterkraftmikroskopie darin, lebende, unfixierte Strukturen in extrem hoher Auflösung abzubilden. Um dies zu realisieren, wurden spezielle Messkammern konzipiert, die zellphysiologische Umgebungsbedingungen während der rasterkraftmikroskopischen Untersuchung ermöglichen. Häufig nähert man sich der objektspezifischen AFM-Untersuchung indem zunächst Experimente unter Raumbedingungen, beispielsweise an luftgetrockneten Zellen durchgeführt werden.

#### 3.1.6.1 Design der einfachen, offenen Flüssigkeitszelle

Im Rahmen dieser Arbeit wurden vordergründig kardiovaskulär relevante Zellen in ihrer physiologischen Umgebung untersucht. Um die Abbildung zellulärer Strukturen zu ermöglichen, muss die Oberfläche des zelltragenden Objektträgers komplett mit zellphysiologischem Puffer bedeckt sein. Außerdem muss die Ablenkung des Lasersignals durch die Vertikalbewegung des Cantilevers weiterhin detektierbar sein. Zu diesem Zweck entwickelten wir eine nicht perfundierbare Flüssigkeitszelle, die in der Handhabung einfach ist und deshalb insbesondere für die Etablierungsphase der Untersuchung eingesetzt wurde. Diese Zelle entsteht, indem auf der Rückseite der keramischen Cantileverkassette ein speziell zugeschnittenes lichtmikroskopisches Deckgläschen mit einem biologisch inerten Klebstoff befestigt wird. Somit bildet man zwischen Probe und Deckgläschen eine nach allen Seiten offene Kammer für die Aufnahme der Flüssigkeiten (Abbildung 32). Makroskopische Meniskuskräfte (Adhäsionskräfte) sorgen dafür, dass die Flüssigkeit in diesem nur wenige Millimeter hohen Spalt gehalten wird. Der Nachteil dieser Zelle besteht darin, dass freies

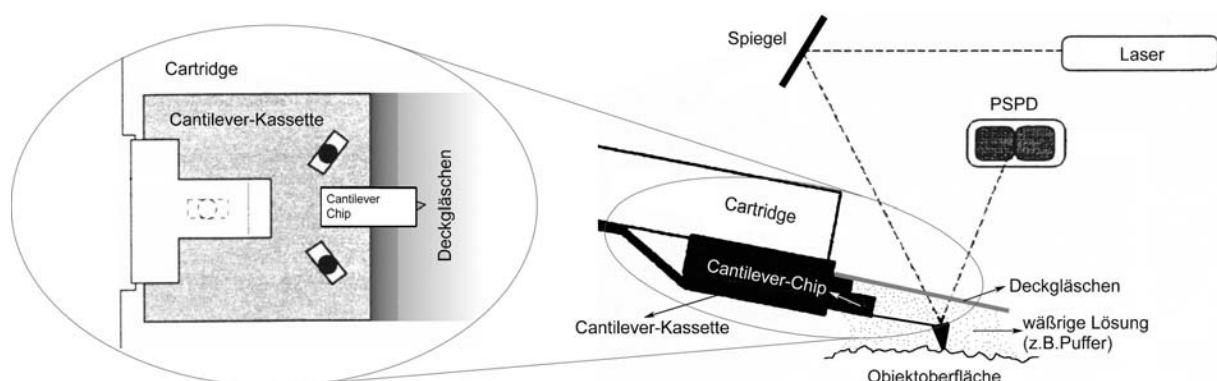


Abbildung 32

Wasser verdunstet und demzufolge die Ionenkonzentration des Puffers mit zunehmender Dauer der Untersuchung stetig zunimmt. Der Vorteil dieser einfachen Flüssigkeitszelle ist in ihrer exzellenten Handhabbarkeit zu sehen. Aufwendiges



Reinigungsprocedere und Justierprobleme sind quasi hinfällig und ermöglichen daher einen raschen Versuchsaufbau.

### 3.1.6.2 Kommerzielle, geschlossene, perfundierbare Flüssigkeitszelle

Trotz der beschriebenen Vorteile der einfachen Flüssigkeitszelle ist diese für die Realisierung optimaler zellphysiologischer Umgebungsbedingungen nicht geeignet. Um stabile Temperatur-, pH- und Konzentrationsbedingungen über einen längeren Untersuchungszeitraum zu gewährleisten, ist der Einsatz der geschlossenen und perfundierbaren Flüssigkeitszelle der Firma PSI unumgänglich. Die Abdichtung der Zelle wird durch einen sehr geschmeidigen Silikonring realisiert, der den Scanvorgang nicht behindert. Der Perfusionsvorgang wird durch jeweils ein Einstrom- und Ausstromröhrchen gewährleistet. Da das Gesamtvolumen, welches diese Flüssigkeitszelle aufnehmen kann maximal 0,1 ml beträgt, haben wir den Volumenaustausch manuell, unter Zuhilfenahme von Mikroliterspritzen vorgenommen. Das pH-stabilisierte Pufferreservoir wurde im Wasserbad um 1,5°C wärmer als benötigt auf 38,5°C temperiert. Dadurch wurde der im Schlauchsystem auftretende Wärmeverlust kompensiert, so dass in der Flüssigkeitszelle eine Temperatur von 37°C gewährleistet werden konnte. Um den Abbildungsvorgang selbst durch die zirkulierende Pufferflüssigkeit nicht zu beeinflussen, wurde das Puffervolumen in der Flüssigkeitszelle jeweils in der Pause zwischen zwei aufeinanderfolgenden Abbildungsvorgängen komplett ausgetauscht. Der während des Scanvorgangs auftretende Wärmeverlust der in der Flüssigkeitszelle befindlichen Pufferflüssigkeit wurde durch ein Miniatur-Thermostat ausgeglichen, welches im nächsten Abschnitt beschrieben wird. Abgesehen vom hohen Pflegeaufwand, Justierproblemen des Laserstrahls und suboptimaler Übertragung der cantilevertreibenden Frequenzen im Non-Contact-Mode (siehe dort) ist die Anwendung der geschlossenen Flüssigkeitszelle unproblematisch und elementare Voraussetzung für die zuverlässige Gewährleistung zellphysiologischer Umgebungsbedingungen während des rasterkraftmikroskopischen Abbildungsvorganges.



Abbildung 33 (PSI®-Foto)

### 3.1.6.3 Temperiereinrichtung

Die o.b. Flüssigkeitszelle ist nicht beheizbar, so dass darin zellphysiologische Temperaturen (37°C) nur durch Vorwärmen der Perfusionsmedien erreicht werden können. Da die perfundierbaren Volumina allein durch die Geometrie der Flüssigkeitszelle begrenzt sind und Volumenaustausch nur zwischen den Messphasen vollzogen wird, ist es notwendig, das in der Flüssigkeitszelle befindliche Volumen des Versuchspuffers zusätzlich zu temperieren, um stabile

Temperaturbedingungen zu garantieren. Zu diesem Zweck wurde an die Unterseite eines metallischen Probenträgers eine speziell konstruierte Miniaturthermostateinheit gekoppelt (Dieter Heinze, Charité Berlin). Um diese Temperiertvorrichtung gegen den Scannertubus zu isolieren, wurde diese in ein Kunstharz mit schlechter Wärmeleitfähigkeit eingegossen. Die Kopplung des Objektträgers (z.B. Thermanox<sup>TM</sup>-Objektträger mit adhärenen Zellen) an den, auf diese Weise beheizten Probenträger erfolgt durch einen wärmeleitenden Kleber oder einfach durch einen Vaselinefilm.

#### 3.1.6.4 Zubehör zur Optimierung der Messbedingungen

Die Abschirmung des gesamten Mikroskops gegen terrestrische Schwingungseinflüsse (Erschütterungen, Schall, Vibrationen von gekoppelten Geräten, etc.) wird nach Einsatz einiger unentbehrlicher Zusatzinstallationen möglich. Zum Lieferumfang des Mikroskops gehören eine Stahl- und eine Glasglocke die zur Abschirmung des interagierenden Sonden-Probenvolumens eingesetzt werden können. Der Nachteil dieser Glocken besteht für die zellphysiologischen Untersuchungen darin, dass lichtmikroskopische Kontrolle des Scannvorganges und Perfusion der Flüssigkeitszelle sowie Steuerung des Miniaturthermostaten nicht mehr möglich sind, wenn diese Abschirmelemente eingesetzt werden. Aus frühen Untersuchungen möglicher Störeinflüsse war uns bekannt, das insbesondere terrestrische Schwingungen sehr stark mit dem Abbildungsvorgang interagieren. Um diesen Einfluss zu minimieren, installierten wir das gesamte Mikroskop inklusive aller gekoppelten Zubehörteile (außer Computer) auf einem pneumatisch gelagerten, schwingungsabsorbierenden Labortisch der Firma Integrated Dynamics Engineering GmbH. Alle von der steuernden Computereinheit ausgehenden Kabel, welche direkte Verbindung zum Mikroskop haben, wurden ebenfalls federnd aufgehangen um Schwingungsübertragung zu vermeiden. Der Effekt dieser Maßnahmen auf die rasterkraftmikroskopische Abbildung wurde schrittweise kontrolliert und dokumentiert. Atomare Auflösung an Glimmer beispielsweise wird nur nach Einsatz aller Abschirmvorrichtungen erzielt. Andere Arbeitsgruppen installieren das gesamte Setup in einem galvanischen Käfig, um elektromagnetische Einflüsse zu eliminieren. Da die atomare Auflösung an zellulären Objekten ohnehin nicht von Interesse ist und aufgrund der Objekteigenschaften biologischer Proben mittels rasterkraftmikroskopischer Methoden theoretisch nicht erreichbar ist, haben wir auf diese zusätzliche elektromagnetische Abschirmung verzichtet. Die Abbildung atomar flacher Proben (Mica) zeigt nach endgültiger Optimierung des gerätetechnischen Aufbaus ein periodisches Störrauschen, welches ungefähr eine Frequenz von 50 Hz und nach topografischer Analyse Amplituden zwischen 10 und 100 Å aufweist. Für die Abbildung zellulärer Strukturen ist dieser Einfluss vernachlässigbar. Die Abbildung präparierter Einzelproteine wird von diesem Störrauschen viel stärker beeinflusst, da die zu detektierenden Strukturen zwischen 100 und 200 Å, also quasi im selben Auflösungsbereich liegen. Das resultierende Signal-Rausch-Verhältnis (~1,0) ist zu ungunsten des Messsignals artefaktüberlagert, so dass mathematische Filteranalysen des Rohbildes nötig sind, um solche Strukturen bildverarbeitungstechnisch sichtbar zu machen.

### 3.1.7 Messsignaldetektion

Interatomare Wechselwirkungskräfte werden im Nahfeld von Objektoberflächen durch die beschriebenen, im Idealfall atomar spitzen Messtips detektiert und bedingen eine messbare Auslenkung des Federbalkens (Cantilevers). Diese Auslenkung wird in den meisten, gegenwärtig kommerziell verfügbaren Rasterkraftmikroskopen laseroptisch gemessen. Der Laser wird über eine Spiegeloptik auf die goldbedampfte, reflektierende Rückseite des Cantilevers adjustiert. Der von dort reflektierte Laserstrahl trifft auf eine positionssensitive Photodiode, die dadurch Veränderungen der Cantileverposition erfasst. Eine andere gängige Detektionsmöglichkeit des rasterkraftmikroskopischen Messsignals wurde in unseren Experimenten nicht angewendet und sei daher nur der Vollständigkeit halber kurz beschrieben. Hierbei wird die Verbiegung des Cantilevers mittels piezokeramischer Schichten, die auf die Rückseite desselben aufgebracht werden, unter Ausnutzung des bereits beschriebenen, direkten piezoelektrischen Effekts gemessen. Durch die Piezobeschichtung werden die Federkonstanten der Cantilever jedoch relativ groß, so dass deren Einsatz an biologischen Objekten nicht favorisiert wird.

#### 3.1.7.1 Positionssensitive Photodioden (PSPD)

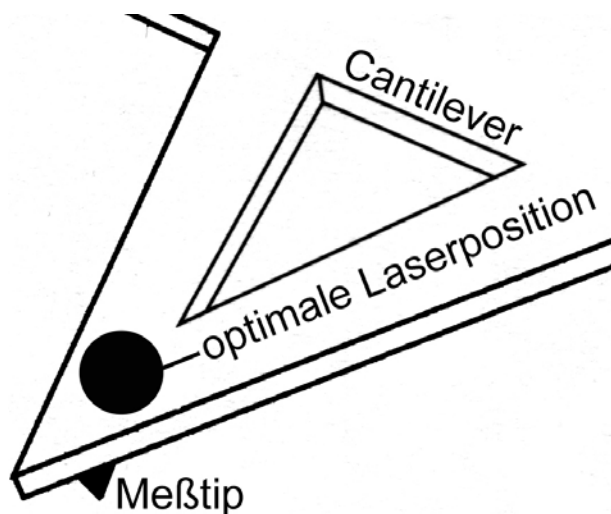


Abbildung 34

Bevor die Messsonde in den Nahbereich der zu untersuchenden Oberfläche gebracht wird, muss der Laserstrahl optik zwischen Laserdiode, Ablenkspiegel, Cantilever und PSPD justiert werden. Zu diesem Zweck positioniert man unter Zuhilfenahme des Ablenkspiegels und lichtmikroskopischer Kontrolle den Laserspot auf der reflektierenden Rückseite des Cantilevers so, dass maximale Fokussierung und Intensität erreicht wird. (Abbildung 34) Die horizontal und vertikal bewegliche PSPD muss nun so eingestellt werden, dass der reflektierte Laserstrahl die Photodiode im Bereich der Grenze

zwischen den Segmenten A und B (siehe Abbildung 35) trifft. Die Optimierung der laseroptischen Achse wird zunächst lichtmikroskopisch kontrolliert. Die Feinjustierung wird mit digitalen Messgeräten, die Spannungsdifferenzen zwischen den Segmenten der Photodiode messen, bewerkstelligt. Die Justierspannungen an der PSPD, auf die an dieser Stelle nicht tiefer eingegangen werden soll, sind im AFM-Handbuch dokumentiert. Die so definierte Nullposition des Cantilevers ist Voraussetzung für den erfolgreichen Annäherungsprozess und die AFM-Abbildung. Unter Bedingungen der o.g. Flüssigkeitszellen ändert sich die optische Achse des Laserstrahls erheblich, so dass die Adjustierung häufig misslingt, da sowohl Ablenkspiegel als auch PSPD nur innerhalb eines definierten Bereiches verstellbar sind. Die Justierung des Lasers gelingt dann nur nach Veränderung der Position des Cantileverchips auf dem Keramikträger. Die Konfiguration der PSPD ist entscheidend

für die detektierbaren Auslenkungen des Cantilevers. Neben rein vertikalen Bewegungen, vollzieht der Cantilever im Contact-Mode auch laterale Verwindungsbewegungen. Diese entstehen bei horizontalen Scanbewegungen durch Reibungskräfte zwischen Tip und Probenoberfläche und sind an biologischen Proben, die im Contact-Mode abgebildet werden hauptsächlich für die abbildungsassoziierte Alteration der Objektoberfläche verantwortlich. Um das Ausmaß dieser Reibungskräfte zu quantifizieren, ist es notwendig, 4-Segment-PSPD zu benutzen (Abbildung 35). An biologischen Proben ist die Kenntnis dieser

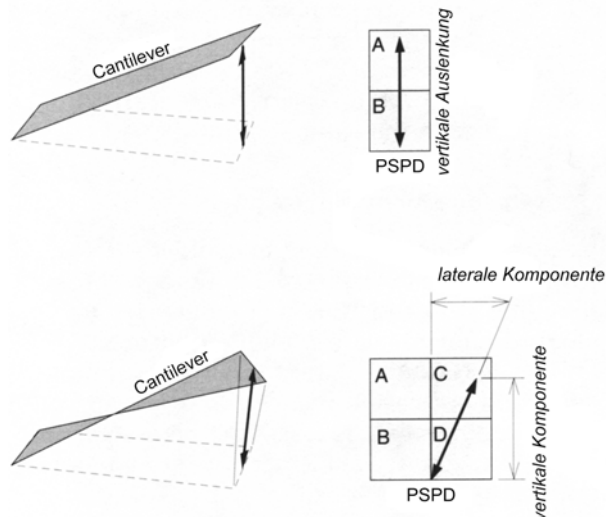


Abbildung 35 aus <sup>85</sup>

Lateralkräfte von Bedeutung, nicht jedoch deren absolute Quantifizierung. Die destruiende bzw. objektalterierende Wirkung dieser Lateralkräfte bei der Abbildung biologischer Objektoberflächen im Contact-Mode ist auch bei Auswahl sehr weicher Cantilever (niedrige Federkonstante) nicht vollständig zu vermeiden. Deshalb wurden andere Messmodi entwickelt, auf die in den folgenden Abschnitten noch genauer eingegangen wird. Der Einsatz der 4-Segment-PSPD ist demnach für unsere Primärfragestellungen nicht zwingend erforderlich. Möchte man jedoch genau diese, aus den Lateralkräften ableitbaren Informationen der Objekt-

oberfläche untersuchen, so ist deren Einsatz unerlässlich. Die sich daraus ergebende modifizierte rasterkraft-mikroskopische Methode wird im allgemeinen Sprachgebrauch als "Lateral Force Microscopy" bezeichnet.

### 3.1.8 Messsignalverarbeitung

Das Ausmaß der interatomaren Wechselwirkungen an jedem Bildpunkt innerhalb des Scanrasters wird in Abhängigkeit von der jeweiligen Laserposition durch die PSPD in definierte Spannungswerte umgesetzt. Diese Spannungen dokumentieren somit indirekt die topografische Höhe (z) jedes Bildpunktes innerhalb eines definierten horizontalen Scanrasters (x, y). Aus der weiteren Verarbeitung dieses Signals ergeben sich prinzipiell zwei gegensätzliche Abbildungsmodi. Bei sehr ebenen Proben, deren vertikale Höhenverteilung im Bereich weniger Nanometer liegt, ist es möglich, das Messsignal der PSPD direkt zur Generierung eines Graustufenbildes zu nutzen. Der Scannertubus vollführt in diesem Modus nur Bewegungen horizontaler Richtung. Demzufolge bleibt der nach Annäherung von Messsonde und Probenoberfläche eingestellte Abstand während des gesamten Scanvorganges konstant, weshalb dieser Modus als Constant-Height-Mode bezeichnet wird. Für Objekte mit ausgeprägterem Höhenprofil (Mikrometerbereich) und für unbekannte, erstmalig zu untersuchende Oberflächen ist dieser Abbildungsmodus völlig ungeeignet, da der Cantilever größere Höhendifferenzen nicht zu kompensieren vermag und die Probe selbst und meist auch der Cantilever während des Scanprozesses zerstört würden. Abgesehen von der Abbildung bekanntermaßen, atomar glatter Oberflächen (Mica) kam dieser Abbildungsmodus während unserer

Untersuchungen nie zur Anwendung. Im sogenannten Constant-Force-Mode oder auch Constant-Signal-Mode wird die nach Annäherung zwischen Messspitze und Probenoberfläche auftretende Interaktionskraft während des gesamten Scanvorganges konstant gehalten. Um dies zu realisieren, wird die PSPD-Signalspannung über eine Rückkopplungsschaltung direkt an den Scannertubus angelegt. In Abhängigkeit von der jeweiligen Spannung vollführt der Scanner kompensatorische Retraktions- bzw. Expansionsbewegungen entlang der vertikalen Achse und reagiert somit auf die detektierte Oberflächentopografie. Der maximal mögliche, vertikale Bewegungsumfang des im Rahmen unserer Experimente zumeist eingesetzten Scanners beträgt  $8\mu\text{m}$ . Objektoberflächen mit noch größeren Höhendifferenzen als  $8\mu\text{m}$  können demzufolge mit unserem mikroskopischen Setup nicht untersucht werden.

### 3.1.9 Betriebsmodus

Man unterscheidet drei AFM-Betriebsmodi. Contact-Mode und Non-Contact-Mode wurden bereits erwähnt. Der prinzipielle Unterschied zwischen diesen beiden Messmodi besteht darin, dass bei erstgenanntem der atomar spitze Messtip physikalischen Kontakt zur Probe hat, wogegen im Non-Contact-Mode der Cantilever über der Probe schwebt. Die Besonderheit dieses Modus ist darin zu sehen, dass der Cantilever durch einen, in den Cantileverhalter integrierten Minipiezo zu Schwingungen angeregt wird. Die Interaktionskräfte zwischen Probe und Spitze führen zur Veränderung der Schwingungsamplitude bzw. der Schwingungsfrequenz, was, wie unter 3.1.7.1 beschrieben, detektiert wird. Das Messsignal des Non-Contact-Mode ist generell schwächer als das des Contact-Mode, was mit Hilfe der Lennard-Jones-Kurve der interatomaren Wechselwirkung sehr gut zu erklären ist (siehe markierte Messbereiche auf der Lennard-Jones-Kurve, S.23). Im Contact-Mode reichen schon sehr geringe Veränderungen der interatomaren Distanz aus, um große Veränderungen der auf den Messtip wirkenden Kräfte zu induzieren. Im Non-Contact-Mode werden gleich große Kraftänderungen nur durch deutlich größere Atomabstände erreicht. Natürlich erlaubt moderne Messelektronik, das Signal des Non-Contact-Mode zu verstärken. Dabei werden aber auch Störeinflüsse, wie z.B. elektrisches Rauschen mitverstärkt. Deshalb ist es eindeutiger, vom schlechteren Signal-Rausch-Verhältnis zu sprechen. Trotz dieses vermeintlichen Nachteils hat die Non-Contact-AFM-Untersuchung insbesondere an biologischen Proben absolute Berechtigung, weil laterale Kräfte zwischen Probe und Spitze nicht auftreten und deshalb das Objekt nicht destruiert werden kann. Wünschenswert wäre unter diesen Gesichtspunkten die Verfügbarkeit eines Messmodus, der die Vorteile beider genannter Modi vereinigt. Einen solchen Modus stellt der Tapping-Mode dar. Bei diesem Modus wird das Cantilever-Tip-System mittels eines spezifisch konfigurierten Cantileverhalters an seiner Eigenfrequenz angeregt. Im Gegensatz zum Non-Contact-Mode wird die Schwingungsamplitude so eingestellt, dass der Tip bei jedem Schwingungsdurchgang einmal die zu untersuchende Probe berührt. Deshalb sprechen einige Autoren auch vom Intermittent-Contact-Mode. Der Tapping-Mode vereinigt die Vorteile beider o.g. Messmodi. Hiermit wird es möglich, bei gutem Signal-Rausch-Verhältnis die prozedural bedingte Alteration der zu untersuchenden Oberflächen zu minimieren. Erst durch die Einführung dieses Modus in die rasterkraftmikroskopische Technik wurde eine artefaktminimierte Abbildung an Oberflächen vitaler Zellen möglich. Die oszillographische Messung der

Eigenfrequenz des Cantilever-Tip-Systems ist beim hier zur Anwendung gekommenen Rasterkraftmikroskop (PSI Autoprobe CP) in der rechnergestützten Mikroskopsteuerung integriert. Das ausführliche Einstellungsprocedere für die einzelnen Messmodi ist im Bedienungshandbuch des Mikroskops eingehend beschrieben.

### 3.1.9.1 Kraft-Abstands-Kurven und ableitbare Funktionen<sup>(modifiziert nach 89,90)</sup>

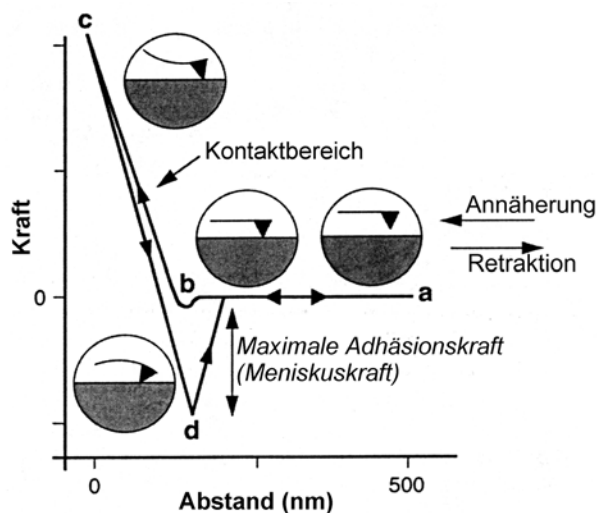


Abbildung 36 modifiziert nach <sup>89</sup>

Landet man mit der Messsonde auf einem definierten Punkt (x,y) der Objektoberfläche, so ergibt sich folgendes Bild (siehe Abbildung 36). Solange Untersuchungsobjekt und Spitze weit genug voneinander entfernt sind, bestehen keine Wechselwirkungen (a) zwischen Atomen der Messsonde und der Oberfläche. Im Nahfeld der Oberfläche dominieren überwiegend anziehende Kräfte, die dazu führen, dass die Spitze und die Probenoberfläche Kontakt gewinnen (sog. „snap-in-point“ (b)). Drückt man nun die Objektoberfläche durch kontrollierte Scannerbewegungen in vertikaler Ebene

weiter gegen die Probe, so wird die Beziehung zwischen Ausmaß der Scannerbewegung und resultierender Kraft zwischen Spitze und Objektoberfläche nur von der Federkonstante des Cantilevers bzw. von den elastischen Eigenschaften der Probe beeinflusst. Die maximale Vertikalbewegung des Scanners (c) wird vor Akquirierung der Kraft-Abstands-Beziehung definiert, um die Zerstörung des Cantilevers durch starke mechanische Beanspruchung (Verbiegung) möglichst zu verhindern. Außerdem ist die maximal erreichbare vertikale Auslenkung des Scanners durch seine piezokeramische Geometrie definiert und begrenzt. Während der weiteren Retraktionsbewegung des Scanners bleibt der Kontakt zwischen Messsonde und Objektoberfläche solange bestehen, wie anziehend wirkende Kräfte zwischen Objekt und Sonde gegenüber den Rückstellkräften (Federkraft) des Cantilevers betragsmäßig dominieren. Am sog. „snap-back-point“ (d) ist die Federkraft des Cantilevers und anziehende Kräfte zwischen Tip und Oberfläche gleich groß. Die weitere Retraktionsbewegung des Scanners bewirkt, dass der bestehende Kontakt zwischen dem Objekt und dem Messtip verloren geht und der Federbalken wieder in seine Ausgangsposition (a) zurückspringt. Dieser Untersuchungsablauf wird über mehrere Zyklen wiederholt und die resultierenden Kraft-Abstands-Kurven werden interpoliert. Die in Abbildung 36 dargestellte Beziehung reflektiert das typische Bild der Kraft-Abstands-Kurve, die unter Raumbedingungen akquiriert wurde. Die Erfassung der punktuellen Kraft-Abstandsbeziehungen an Oberflächen der zu untersuchenden Objekte ermöglicht die Detektion störender Interaktionskräfte (Physiosorption, Meniskuskraft, elektrostatische Kräfte, etc.). Untersucht man Kraft-Abstands-Beziehungen beispielsweise unter Vakuumbedingungen, wo die erwähnten Störfaktoren nicht präsent sind, verändert sich das Bild in der Form, dass „snap-in“- und „snap-back-

point“ denselben Punkt beschreiben, und dass die Kraft-Abstands-Kurve, die während der vertikalen Expansionsbewegung des Scanners aufgenommen wurde deckungsgleich zu der Kurve ist, die durch die Retraktionsbewegung des Scanners beschrieben wird. Besonderes Interesse erlangt die rasterkraftmikroskopische Messung von Kraft-Abstands-Kurven unter dem Gesichtspunkt, dass bei bekannter, definierter Federkonstante des Cantilevers, die Kraft-Abstands-Beziehung im Kontaktbereich zwischen Sonde und Oberfläche nur von den elastischen Eigenschaften des Untersuchungsobjektes bestimmt wird. Diese im angloamerikanischen Sprachraum als „visco-elastic-indentation“ bezeichnete „Eindrückbarkeit“ der Oberfläche ist punktuell messbar. Radmacher et al.<sup>93</sup> entwickelten eine Methode („Force-Mapping“) diese punktuell detektierbaren, visko-elastischen Oberflächenparameter an jedem Bildpunkt eines definierten Punktrasters aufzuzeichnen und eröffneten damit die Möglichkeit, topografische und assoziierte visko-elastische Informationen der selben Untersuchungsoberfläche kombiniert zu untersuchen.

## 3.2 Probenpräparation

### 3.2.1 Kardiovaskuläre Zellen aus immortalen Zellkulturen

#### 3.2.1.1 Bovine aortale Endothelzellen (BAEC)

BAEC sind immortale Endothelzellen aus der Rinderaorta, die wir bei ATCC (American Type Culture Collection) kommerziell erwarben. Wir kultivierten diese Zellreihe mit folgenden Medien:

- Dulbeccos®- Nährmedium
- 10 %-iger Zusatz von fötalem Kälberserum (FCS®)
- dazu 20 ml SC-Zusatz (Natriumpyruvat, Natriumhydrogenkarbonat, Penicillin/Streptomycin-Antibiotikagemisch) pro Liter Nährmedium.

Die Kultivierung erfolgte nach Passage bzw. nach dem Auftauen der aliquotierten Stammzellen in Zellkulturflaschen (175 cm<sup>2</sup>, Firma Nunc), im Brutschrank bei 37°C und 5 %-iger CO<sub>2</sub>-Begasung. Die Passagezeit (Zeitraum vom Ausplattieren der Zellen bis zum Erreichen der Konfluenz eines endothelialen Layers) betrug in Abhängigkeit vom Alter der Zellen zwischen 72 und 84 Stunden. Nach dieser Zeit wurden die Zellen mittels Trypsin und mechanisch („rubber-policeman“) vom Boden Zellkulturflasche abgelöst und entweder weiterpassagiert oder für AFM-Versuche auf geeignete Objektträger (CELLocate®-Coverslips, Firma Eppendorf) ausplattiert. Dreiviertel des nach Zentrifugation in 4 ml Medium resuspendierten Zellpellets wurden in drei neuen Kulturflaschen weiterpassagiert. Das verbliebene Viertel (1 ml) wurde zu gleichen Teilen auf 4 bis 5 mit Laminin (Zellstrukturprotein; 100 µl/1 cm<sup>2</sup> Laminin) beschichtete CELLocate® ausplattiert. Nach weiteren 24 bis 36 Stunden im Kulturschrank wurden die Zellen bei erreichter Subkonfluenz rasterkraftmikroskopisch unter Einsatz der o.b. Flüssigkeitszellen untersucht. In der Etablierungsphase dieses Experiments wurden die Zellen 10 Minuten mit 1 %-igem Glutardialdehyd bei 8°C und bei Raumtemperatur fixiert, um Oberflächenproteine zu vernetzen und damit die Stabilität der Membranoberflächen zu verbessern.

Die ersten Zellen, die rasterkraftmikroskopisch untersucht wurden, waren avitale, im Exsikkator luftgetrocknete BAEC die aber auch unter Bedingungen der Flüssigzelle in PBS (phosphate buffered saline) abgebildet und an den Kraft-Abstands-

Untersuchungen vorgenommen wurden. Die gewählten, AFM-spezifischen Abbildungsbedingungen werden im Ergebnisteil ausführlich besprochen.

### 3.2.1.2 Myozyten H9C2

H9C2 sind immortale, ventrikuläre, myoblastäre Zellen, die ebenfalls bei ATCC (American Type Culture Collection) kommerziell verfügbar sind. Wir kultivierten diese Zellreihe mit folgenden Medien:

pro 500 ml Lebovitz®- Medium

- 5 ml PenStrep®
- 5 ml L-Glutamin
- 250 mg BSA (500 µg/ml Endkonzentration)
- 50 ml FCS®
- 1,05 g NaHCO<sub>3</sub> (25 mM Endkonzentration)
- 5 ml MSG® (1x) (GIBCO KatNo.: 41400-37)
- 5 ml Glucose 30 %

Alternativ dazu bietet ATCC H9C2-Medium an, welches folgende Bestandteile enthält:

- DMEM® (Dulbeccos modified Eagle Medium) mit Glutamin
- 10 % FCS (bis 1 % reduzierbar)
- 5 ml Pen-Strep®

Die Kultivierung erfolgte nach Passage bzw. nach dem Auftauen der aliquotierten Stammzellen in Zellkulturflaschen (175 cm<sup>2</sup>, Firma Nunc), im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung. Die Passagezeit lag bei ca. 60 Stunden. Nach dieser Zeit wurden die Zellen trypsiniert und mechanisch vom Boden Zellkulturflasche abgelöst und entweder weiterpassagiert oder für AFM-Versuche auf geeignete Objektträger nach dem o.b. Schema ausplattiert. Nach weiteren 24 Stunden im Kulturschrank wurden die Zellen bei erreichter Subkonfluenz rasterkraftmikroskopisch unter Einsatz der Flüssigzelle untersucht. Auch diese Zellreihe wurde in der Etablierungsphase des AFM-Experiments 10 Minuten mit 1 %-igem Glutardialdehyd bei 8°C oder bei Raumtemperatur fixiert und unter zellphysiologischen Bedingungen abgebildet. Alle weiteren Versuche wurden an unfixierten, vitalen Zellen durchgeführt.

### 3.2.2 Aortale Endothelzellen im Gewebsverband

Die Untersuchung von gewebsgebundenen endothelialen Zellverbänden war primär darauf ausgerichtet, die Möglichkeiten der in-vitro-Rasterkraftmikroskopie zu evaluieren. Dazu wurde die thorakale Aorta descendens von Ratten, Meerschweinchen und Kaninchen präpariert. Die hierfür benötigten Tiere wurden im Rahmen geplanter Experimente anderer Arbeitsgruppen unserer Klinik (Langendorf-Herzmodell, isoliert perfundierte Lunge etc.) sediert, thorakotomiert und anschließend versuchsspezifische Organentnahmen durchgeführt. Im Anschluss daran entnahmen wir nach Kanülierung und proximaler Ligatur des Arcus aortae, unter kontinuierlicher Infusion von modifizierter physiologischer Krebs-Henseleit-Lösung (116,4 mM NaCl; 9,9 mM Glukose; 24,9 mM NaHCO<sub>3</sub>; 5,9 mM Hepes-Puffer, 4,02 mM KCl; 1,26 mM CaCl<sub>2</sub>; 1,116 mM MgSO<sub>4</sub>; 1,19 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) die thorakale Aorta vom Arcus aortae bis zu den proximalen Anteilen der Aa. Iliacae communes.



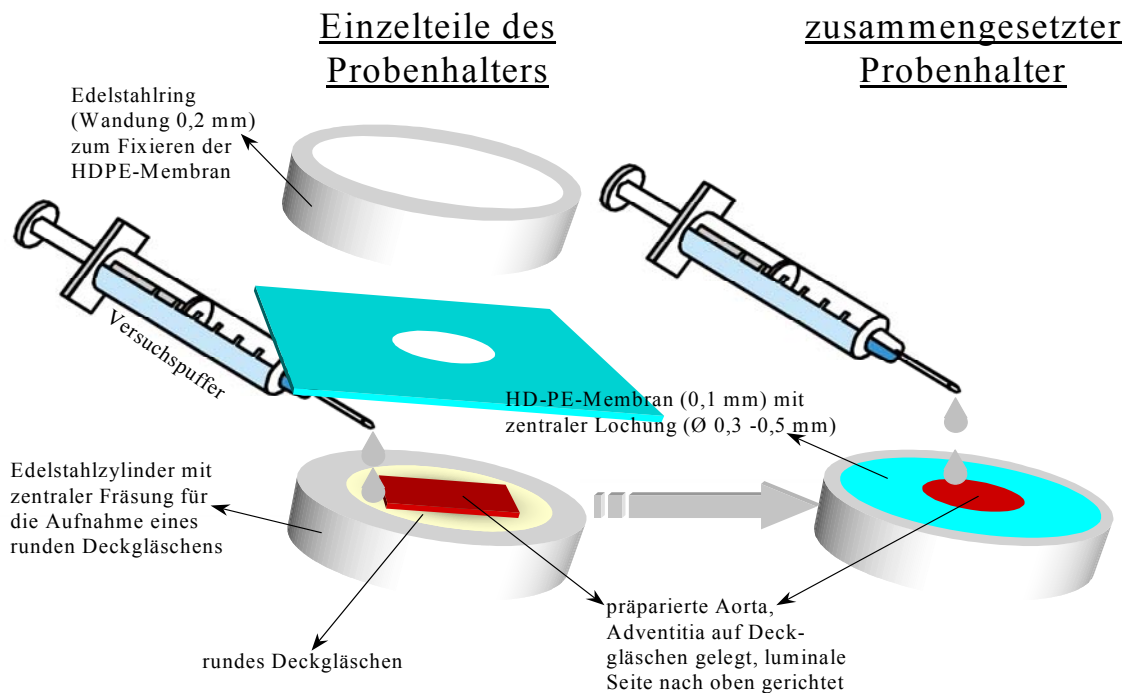


Abbildung 37

Die so dargestellte und exzidierte Aorta wurde im physiologischen Medium longitudinal auf ganzer Länge inzidiert, um das Gefäßendothel der AFM-Untersuchung zugänglich zu machen. Die Fixierung des Gewebblocks auf dem magnetischen Scannertubus des AFM erfolgte mittels eines speziell für diese Versuche konzipierten und konstruierten Probenhalters. Bei der in Abbildung 37 schematisierten Probenaufnahme wird der Gewebblock zwischen einer sterilen HD-PE-Folie und einem Glasdeckgläschen festgeklemmt, so dass die zu untersuchende Region des Aortenendothels unter den Bedingungen der beschriebenen AFM-Flüssigkeitszelle darstellbar ist.

### 3.2.3 Primär isolierte Zellen

#### 3.2.3.1 Adulte Kardiomyozyten und kardiale FLC (fibrocyte like cells)

Die Primärisolation kardialer Zellen von unterschiedlichen Spezies (Ratte, Mensch) wurde im kardiologischen Forschungslabor der Medizinischen Klinik und Poliklinik der Charité routinemäßig unter Anwendung der Jakobsen-Methode in einer modifizierten Langendorf-Perfusions-Apparatur durchgeführt. Für die Primärisolation humaner Kardiomyozyten wurde linksventrikuläres Myokard verarbeitet, welches im Rahmen herzchirurgisch-resezrierender Operationen (linksventrikuläre Aneurysmektomien, partielle Ventrikulektomie nach Batista) gewonnen wurde. Diese Eingriffe werden in der Herzchirurgischen Klinik der Charité regelmäßig durchgeführt und die Transferzeit von der Entnahme des Resektats bis zum Start des Isolationsprozederes von Primärzellen im Zellkulturlabor betrug 25 bis 40 Minuten.

Die Tiere wurden durch intraperitoneale Injektion von Trapanal getötet, anschließend auf einer speziellen Präparierplatte fixiert und die Haut mit unsterilem Besteck abpräpariert. Unter jetzt sterilen Kautelen wurden die Rippen beidseits durchtrennt, das Sternum hochgeklappt und die eröffnete Thoraxhöhle mit kaltem, sterilem PBS gespült. Nachfolgend wurde das Herz chirurgisch unter kontinuierlicher Eiswasserspülung am Gefäßstiel entnommen und an der Aorta ascendens mittels einer Ringligatur in der Langendorffapparatur aufgehängt. Das humane Myokard wurde entweder an einer kanülierbaren Koronararterie des Resektats oder durch interstitielle Kanülierung (4-5 Kanülen) angeschlossen. Das Perikard der Tierherzen wird steril abpräpariert und unmittelbar danach erfolgt die Perfusion mit kalziumhaltigem Krebs-Henseleit Medium (KHM) bis zum steady state (normalisierter und konstanter dp/dt) für ca. 15 min. Unter nachfolgender Perfusion mit kalziumfreiem Krebs-Henseleit Medium für ca. 15 min wird ein kardioplegischer Effekt erzielt und die Herzaktion sistiert. Diese Prä-Perfusionen werden druckkonstant bei 24 mmHg durchgeführt, um das Herz von Blutresten zu säubern und Kalzium aus dem Interstitium zu entfernen, was zu einer Lösung der Disci intercalares führt.

<u>KH-Medium (kalziumfrei):</u>		<u>KH-Medium (kalziumhaltig):</u>	
NaCl	6,8 g/l	NaCl	6,8 g/l
Glucose	1,8 g/l	Glucose	1,8 g/l
NaHCO <sub>3</sub>	2,092 g/l	NaHCO <sub>3</sub>	2,092 g/l
Hepes	1,4 g/l	Hepes	1,4 g/l
Pyruvat	0,22 g/l	Pyruvat	0,22 g/l
KCl	0,3 g/l	KCl	0,3 g/l
MgSO <sub>4</sub>	0,29 g/l	MgSO <sub>4</sub>	0,29 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,163 g/l	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,163 g/l
		CaCl <sub>2</sub>	0,735 g/l

Beide Medien werden mit folgenden antibiotischen Zusätzen versetzt:

- 1 ml Gentamicin® (50 mg/ml)
- 10 ml PenStrep® (5000 IU/ml = 5000 µg/ml)

Durch Umlegen eines Drei-Wege-Hahnes wird die Perfusion mit Enzymlösung gestartet. Nach etwa einer Minute wird der Auffangtrichter der Langendorff-Apparatur unter das Herz (humanes Ventrikelresektat) geschwenkt und soweit nach oben geschoben, dass das Herz vollständig in ihm versenkt ist, jedoch frei hängt. Der Verschluss des Trichters mit einem Plexiglasdeckel sorgt nun für den Abschluss der Klimakammer. Das Herz wird nun 30-50 min. perfundiert, um das Bindegewebe zu verdauen. Um Enzymlösung zu sparen, wurde der Puffer in das Vorratsgefäß zurückgepumpt und reoxygeniert, das Herz somit rezirkulierend perfundiert. Der koronare Fluss wurde gemessen und alle zwei Minuten protokolliert. Als Zeichen eines fortschreitenden Bindegewebsverdaus stieg dieser gegen Ende der Enzymperfusion stark an.

Die spezielle Proteasen-Perfusionslösung besteht aus folgenden Substanzen:

- 10 mg Trypsin / 75 ml kalziumfreies KHM
- 70 mg Kollagenase Typ II / 75 ml kalziumfreies KHM
- 120 mg BSA / 75 ml kalziumfreies KHM

Um die für längere Lagerung unerwünschten Enzyme zu entfernen, wurde anschließend noch mit Hoch-Kalium-Puffer für ca. 5 Minuten nachperfundiert. Im Anschluss daran, wird das Herz aus Langendorffapparatur entnommen und in einer sterilen Petrischale werden zuerst die Vorhöfe und die Gefäße abpräpariert, um danach das Herz in kleine Stückchen (2-3 mm<sup>2</sup>) zu zerschneiden. Das so gewonnene

Myokard wird in o.b. Proteasenlösung durch Rückwärtsbegasung ca. 20 min gemischt. Mittels steriler Entnahme kleiner Mengen (Pipette) aus diesem Lysat wird Lyseeffekt regelmäßig mikroskopisch kontrolliert. Im Anschluss daran wird das Lysat durch ein Nylonnetz (200 µm Porengröße) filtriert, um unverdaute Gewebsreste zu entfernen. Das gewonnene Filtrat wird bei 300 U/min, 4 Minuten zentrifugiert. Um optimale Trennung der myozytären Komponenten von den Bindegewebszellen zu erzielen, kann optional eine Zentrifugation bei 800 U/min für 2 Minuten zusätzlich durchgeführt werden. Das zumeist gut sichtbare Zentrifugat (Myozytenpellet) wird nach Absaugen des Überstandes in M 199 mit 20 % fötalem Kälberserum (FCS) aufgenommen und resuspendiert. Mittels einer Neubauer-Zählkammer wurde die Myozytenkonzentration ermittelt. Die auf diese Weise isolierten Myozyten wurden auf speziellen Objektträgern (CELLocate®) in 6- oder 24- Well-Kammern ausplattiert und für maximal 12h im Brutschrank inkubiert. Die fibrozytären und fibroblastären Elemente werden gewonnen, indem man die o.g. Nylonnetzfiltration unterlässt und im Anschluss daran nur den ersten der beiden Zentrifugationsschritte durchführt. Die daraus hervorgehenden Zellpellets werden ausplattiert ebenfalls in M 199 (+20 % FCS) und man findet neben Myozyten, gehäuft Fibrozyten und Fibroblasten.

### 3.2.3.2 Isolation neonataler Ratten Myozyten (NBR-Myozyten)

Wir bezogen 2-3 Tage alte, neonatale Ratten (Schwangerschaftsdauer 3 Wochen) aus dem Tierstall der Charité. Zunächst wurden die Tiere in Aqua dest. und in Ethanol in einer großen Petrischale gewaschen. Unmittelbar danach töteten wir die neonatalen Ratten per Genickbruch mit einer Kocherklemme. Nach Spreizen des Thorax mit einer Pinzette wurde das Sternum durchtrennt und gespreizt. Anschließend entnahmen wir das Herz mit einer sterilen Pinzette und überführten es in eine sterile, vorgekühlte Petrischale mit 30 ml HBSS (Hank's balanced salts - ohne  $\text{Ca}^{++}$  und  $\text{Mg}^{++}$  mit Phenolrot und ohne PenStrep®). Die Vorhöfe wurden mit 2 Pinzetten unter ständiger HBSS-Spülung abpräpariert. Die verbleibenden Ventrikel überführten wir im Anschluss daran in eine Petrischale mit 30 ml frischem HBSS. Nachfolgend zerkleinerten wir die so gewonnenen Ventrikel unter der Sterilbank mit 2 Skalpell in ca. 6-7 Stücke. Nach Präparation von 20 Herzen füllten wir die Petrischale mit 40 ml Trypsinlösung (2,0 ml je Herz) auf. (Trypsin 0,1 % in HBSS [500 mg / 500 ml] pH 7,2, steril filtriert [0,22µm Falcon®-Filter], Trypsin Typ II Sigma T8128 aus Schweinpankreas). Die Andauung der extrazellulären Matrix der neonatalen Ventrikel erfolgte ca. 16h bei 4°C im Kühlschrank. Am darauffolgenden Tag wurde die Trypsinierung beendet und die Zellen wurden in 40 ml Medium (Medium M199 + 10 % NBSC [new born calf serum GIBCO KatNo.: 16010-084 Lot: 30F0843D] + 1 % PenStrep® [GIBCO KatNo.: 15140-023] ausplattiert. Anschließend wurden die Zellen erneut in einer 25 ml Pipette aufgesaugt, und in 70 ml Medium in einem Erlenmeyerkolben mit seitlichem Auslass resuspendiert. Nach 25-minütigem trypsinieren (Resttrypsinaktivität), 6-8 minütigem Repipetting zum Auflösen der letzten Gewebsbestandteile, und 10-minütigem Sedimentieren der Zellen (Bindegewebszellen) im Medium wurde der Überstand erst in ein BlueCap®, und dann in eine Kulturflasche mit 20 ml Medium (um Flusenfreiheit zu kontrollieren) überführt und resuspendiert. Dieser in der Kulturflasche resuspendierte Überstand wurde 1h im Brutschrank (37°C; 5 %  $\text{CO}_2$ ) inkubiert und nachfolgend auf die o.b. AFM-Objektträger (CELLocate®) ausplattiert. Am 3. Tag wurden die Zellen nochmals mit temperiertem Medium gewaschen. Weitere Mediumwechsel wurden alle 2-3

Tage durchgeführt. Nach 5-6 Tagen waren die neonatalen, ventrikulären Myozyten subkonfluent und wurden der rasterkraftmikroskopischen Untersuchung im Zellkulturmedium zugeführt. Um die Bindegewebszellen der neonatalen Rattenherzen zu isolieren, wurden die sedimentierten (s.o.) Zellen, nach Absaugen des Zellkulturmediumüberstandes in o.b. Medium resuspendiert und wie unter 3.2.3.1 beschrieben ausplattiert und kultiviert.

### 3.2.4 Thrombozyten

Wir präparierten die Blutplättchen zunächst aus Vollblut, welches auf einen silanisierten Glasobjektträger aufgetropft wurde. Nach 5-10 minütiger Inkubationszeit wurde der Blutstropfen mittels mehrmaliger, forcierter Spülung vom Objektträger heruntergewaschen. Die auf dem Objektträger verbleibenden zellulären Bestandteile wurden als kontaktaktivierte Thrombozyten identifiziert und der AFM-Untersuchung zugeführt. Bei initialen Versuchen bedienten wir uns dieser einfachen Methode, stellten allerdings fest, dass sowohl Größe als auch Morphologie der rasterkraftmikroskopisch abgebildeten Zellen extrem differierten und der Eindruck entstand, dass neben den aktivierten Thrombozyten auch andere zelluläre Blutbestandteile auf dem Glasobjektträger verbleiben und abgebildet werden. Deshalb entschlossen wir uns, Proben aus Thrombozytenkonzentrate, die uns durch das Institut für Transfusionsmedizin der Charité (Prof. Kieseewetter) zur Verfügung gestellt wurden, für weitere experimentelle Ansätze zu nutzen. Der Reinheitsgrad dieser Präparate ist >99 %, so dass von einer reinen Thrombozytenpopulation in unseren Proben auszugehen war. Diese Thrombozytenkonzentrate wurden auf einen silanisierten Glasobjektträger aufgetropft, unter Brutschrankbedingungen 15 Minuten inkubiert und im Anschluss wie oben beschrieben mittels plasmaitotoner Spüllösung (PBS) gewaschen und unmittelbar danach der AFM-Untersuchung unter zellphysiologischen Bedingungen (PBS-Puffer, 37°C) zugeführt. Für die Untersuchung der Thrombozytenmorphologie auf koronarinterventionellen Stentoberflächen wurde das gleiche präparative Setup verwendet, wobei die Stentoberfläche vor Inkubation mit den Thrombozytenkonzentraten nicht spezifisch vorbehandelt wurde.

### 3.2.5 20S-Proteasom

Die Präparation der 20S-Proteasomen wurde von Herrn Dr. Christoph Günther (Medizinische Klinik und Poliklinik I der Charité) realisiert. Das angewandte Präparationsprocedere ist im Material- und Methodenteil der Publikation von Stohwasser et al.<sup>91</sup> ausführlich beschrieben. Die in PBS suspendierten Proteasomen wurden unter Raumbedingungen 20 Minuten auf einer Mica-Oberfläche (atomar glatter Glimmer) inkubiert und unter zellphysiologischen Bedingungen der AFM-Untersuchung zugeführt. Die theoretischen Hintergründe dieses Untersuchungsansatzes werden im Ergebnisteil ausführlich beschrieben.

### 3.2.6 Koronarinterventionelle Stents

Es wurden Proben der luminal gerichteten Oberflächen koronarinterventionell relevanter Materialien (Stents) präpariert. Dabei ist das Präparationsschema für die unterschiedlichen Materialien und die verschiedenen Dilatationszustände der Stents normiert. Folgende Schritte sind notwendig :

- Entnahme der Stents aus der sterilen Verpackung
- Aufziehen des Materials auf einen Silikonschlauch passenden Durchmessers
- mikromanipulatorisches Zerteilen (alternativ Laserschneiden) des gesamten Stents in drei gleichgroße Abschnitte (ohne den Stent mechanisch zu deformieren)
- tangentiales Auftrennen der zylindrischen Stentanteile, um Einzelmaschen zu präparieren
- Aufkleben der Einzelmaschen des Stents auf 25 mm Glasdeckgläschen mittels eines biokompatiblen und thermostabilen Zweikomponenten- Epoxidharzes (EPO- TEC 302-3M) in der Form, dass die konvexe (in-situ abluminal gerichtete) Stentoberfläche mit dem Kleber in Kontakt kommt und die zu untersuchende konkave (in-situ luminal gerichtete) Oberfläche planparallel zum Objektträger nach oben orientiert ist
- 3-stündige Trocknung bei 65°C im Trockenschrank

#### 3.2.6.1 Reinigung der Stentoberfläche

- Stentmaschen für 2h in hochkonzentriertem Detergens (Tween) einlegen
- intensives Spülen mit deionisiertem Aqua bidest.
- 7 min. Bestrahlung mit UV- Licht (256 nm Wellenlänge)
- wiederholtes Spülen mit deionisiertem Aqua bidest.
- Ultraschallreinigung in 98 % Ethanol (5 min cont.)
- erneutes Spülen mit deionisiertem Aqua bidest.
- Plasmaätzen der Probenoberfläche (Institut für Anatomie der Charité)
- Überführung und Lagerung der gereinigten Probe im Exsikkator

#### 3.2.6.2 Dilatation der Stents

Die Stents werden mit dem kommerziell verfügbaren PTCA- Set (Ballonkatheter und Insufflator) dilatiert, wobei das in vivo Elastizitätsmodul der Koronararterienwand mittels eines normierten Silikonschlauches (Innendurchmesser 3,5 mm) in vitro simuliert wird. Dabei sollen die vom Hersteller angegebenen optimalen Dilatationsdrücke (6 –8 atm) insuffliert werden. Danach erfolgte das o.b. Procedere.

#### 3.2.6.3 Zellpräparation auf Stentoberflächen

Die auf Glasobjektträgern präparierten Einzelmaschen der verschiedenen Stenttypen und der jeweiligen Dilatationszustände der Stents werden autoklaviert und im Zelllabor mit humanen Thrombozytenkonzentraten inkubiert (s.o.). Die primäre Stentstruktur sollte dabei neben den zellulären Strukturen mikroskopisch erkennbar

und beurteilbar bleiben. Deshalb wurden die Thrombozytenkonzentrate 1:10 in PBS verdünnt. Bei Inkubation der präparierten Stentmaschen mit unverdünnten Thrombozytenkonzentraten imponierten die Thrombozyten quasi konfluent auf der Stentoberfläche, so dass eine Beurteilung der zellulären Kontaktzonen mit der Stentoberfläche kaum noch möglich war.

#### 3.2.6.4 AFM- Abbildung der Stentoberflächen

- Messung erfolgt unter Flüssigkeit (Aqua dest. bzw. bei den zellbewachsenen Proben in physiologischem Puffer z.B. PBS) in der Flüssigzelle (PSI- liquid- cell)
- Intermittent-Contact-Mode AFM mit Microlever 0,6  $\mu\text{m}$  Typ A (typische Kraftkonstante 0,05 N/m)
- Scanareal für Rauigkeitsanalyse/ Einzelbild 25  $\mu\text{m}$  x 25  $\mu\text{m}$
- Zentralbild des 5x5- Rasters wird hochaufgelöst (100 $\mu\text{m}^2$  bis 5 $\mu\text{m}^2$ )
- Registrierung der Topography- und Error-Mode Bilder (512x512 Pixel)
- Schnelle-Scan-Richtung bei allen Scans ist x-orientiert
- Die Bildreihenfolge der Einzelscans wird wie in der folgenden Abbildung gezeigt, realisiert

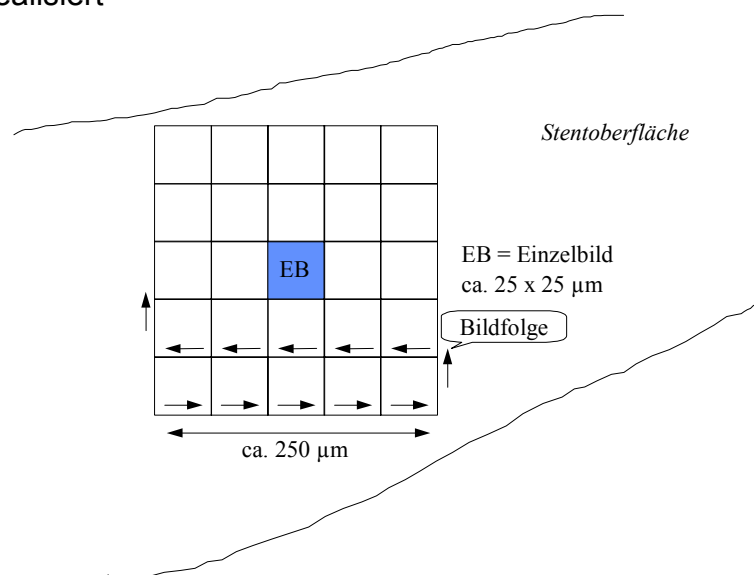


Abbildung 38

#### 3.2.6.5 Bildverarbeitung

Die Analyse und Bildverarbeitung erfolgt mit der Bildverarbeitungssoftware der Firma PSI (Proscan 1.5) und dem Adobe Photoshop (Version 5.0). Näheres hierzu ist im Bedienungs-Handbuch des Mikroskops ausführlich beschrieben.

#### 3.2.6.6 Rauigkeitsanalyse der Stentoberflächen

Die in-situ nach endoluminal gerichtete Oberfläche des in Abbildung 39 schematisierten Palmaz-Schatz-Stents wird hinsichtlich der zu ermittelnden Rauigkeitsparameter in unterschiedlichen Regionen untersucht. Dazu werden Einzelscans der Größe 25 $\mu\text{m}^2$  aus den entsprechenden Stentregionen akquiriert.

Untersucht werden die integrale Oberflächenrauigkeit (n=30 Einzelscans) und die Rauigkeit in den Bereichen besonderer, bei Dilatation des Stents auftretender, mechanischer Beanspruchung (Quersteg, Längssteg, Kniebereich des Stents). Von diesen Bereichen werden jeweils 5 repräsentative, 25µm<sup>2</sup> große Scans akquiriert. Die nach Bildprozessierung und Analyse (Proscan 1.5) ermittelten Rauigkeitsparameter werden an nativen und an dilatierten Stentoberflächen verglichen, um den Einfluss des Dilatationsprocedures auf die Oberflächenrauigkeit (möglicher Thrombogenitätsfaktor) zu ermitteln.

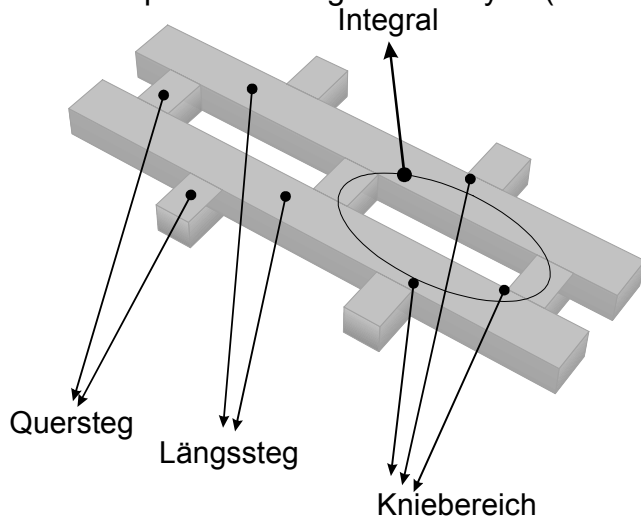


Abbildung 39

### 3.2.6.6.1 Berechnete Rauigkeitsparameter

Digitale Bilder werden durch Pixel beschrieben, wobei sich jeder Bildpunkt aus jeweils einer x-, y- und z- Koordinate zusammensetzt. Im Falle der hier ausgewerteten Topografiebilder (512 x 512 Pixel)

werden den z- Werten (256 Graustufen) geometrische Höhen durch Kalibrierung (siehe oben) zugeordnet. Folgende Rauigkeitsparameter wurden aus diesen Messkoordinaten berechnet:

- mean height (mittlere Höhe) :

Der Mittelwert der Grauwerte wird mathematisch wie folgt definiert :

$$\bar{Z} = \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N Z_n, \text{ wobei } N = \text{Anzahl der Datenpunkte (512x512 Pixel / Bild)}$$

- median height (mediane Höhe) :

Die mediane Höhe ist diejenige Höhe , die das Grauwerthistogramm in zwei gleich große Flächen einteilt. 50 % der Datenpunkte haben höhere Beträge und 50 % der Daten niedrigere Beträge als der Median- Wert.

- Rp-v (maximale Höhendifferenz) :

Rp-v wird definiert durch die Differenz des größten und des niedrigsten Wertes innerhalb einer eingeschlossenen Region.

$$R_p - v = Z_{\max} - Z_{\min}$$

- Average (ave)- roughness = R(ave) (mittlere Rauigkeit) :

Die durchschnittliche Rauigkeit wird durch die mittlere Abweichung vom Mittelwert innerhalb der eingeschlossenen Region definiert.

$$R_{ave} = \sum_{n=1}^N \frac{|z_n - \bar{z}|}{N}, \text{ wobei } \bar{z} = \text{Mittelwert der Datenpunkte}$$

- root- mean- squared (rms)- roughness = R(rms) (Standardabweichung) :

$$R_{rms} = \sqrt{\frac{\sum_{n=1}^N (z_n - \bar{z})^2}{N - 1}}, \text{ wobei } \bar{z} = \text{Mittelwert der Höhenpunkte}$$

Da die  $R_{rms}$  quadratische Werte enthält, werden große Abweichungen vom Mittelwert schwerer gewichtet als durch die  $R_{ave}$ . Aus dem gleichen Grund fallen kleine Abweichungen vom Mittelwert bei der  $R_{rms}$  weniger ins Gewicht als bei der  $R_{ave}$ .



## 4 Ergebnisse

Nachdem es uns gelungen war, mit unterschiedlichsten Cantilevern (Microlever und Ultralever der Firma PSI) und unter Ausnutzung bereits bekannter und publizierter Messprotokolle an Festkörperoberflächen (z.B. Silizium, Glimmer etc.) und an quasi amorphen, biologischen Substratoberflächen (z.B. Dentin) die dreidimensionalen Auflösungsmöglichkeiten der Rasterkraftmikroskopie wie vorbeschrieben zu reproduzieren und ausreichende Erfahrung im Umgang mit dem PSI- Autoprobe CP®-Rasterkraftmikroskop zu sammeln, begannen wir mit der Untersuchung zellulärer Strukturen. Bereits bei der Abbildung kristalliner Festkörperoberflächen war festzustellen, dass die Auflösungsqualität insbesondere im atomaren Hochauflösungsbereich extrem von optimierten Messbedingungen (Betriebsmodus, Wahl des Cantilevers, Einfluss terrestrischer Störungen etc.) abhing und dass eine hinreichende Reproduzierbarkeit der Abbildungs- und Messergebnisse an diesen Substraten oft nicht möglich war. Dennoch gelang es durch o.b. Kalibrierprocedere (vor jeder neuen Versuchsreihe führten wir eine komplette Kalibrierung des Mikroskops durch, siehe Kap. 3.1.4.4) und durch Ausschaltung möglicher terrestrischer Störeinflüsse (mechanische Schwingungen, elektromagnetische Felder, Umgebungstemperaturschwankungen etc.) mittels spezieller Abschirmvorrichtungen (pneumatisch gelagerter Mikroskoptisch; Schallschutzglocke; galvanischer Abschirmkäfig; federnde Aufhängung aller unmittelbar mit dem Mikroskop verbundenen Kabel; Raumklimatisierung; gesteuerte Temperierung des Probenträgers im Mikroskop) bei unveränderten Mikroskopeinstellungen (Scanfrequenz, Auflagekraft der Messspitze, Betriebsmodus, Signalverstärkung) und unter Verwendung eines definierten Cantilevers, eine hinreichende Reproduzierbarkeit der Messergebnisse an den genannten Festkörperoberflächen zu erzielen. Dieses optimierte Setup war grundlegend notwendig, um mit der rasterkraftmikroskopischen Untersuchung biologischer, polymorpher, funktionell dynamischer und durch andere hochauflösende Methoden, zumindest im vitalen Funktionszustand nur unzureichend charakterisierter Zelloberflächen zu beginnen. Das zu untersuchende biologische System (Zelloberfläche) ist funktionsassoziiert so polymorph, dass jegliche systembedingten Abbildungs- und Messartefakte des Rasterkraftmikroskops weitgehend eliminiert sein sollten, um eine Vergleichbarkeit der Messergebnisse an zellulären Strukturen überhaupt zu ermöglichen. Da kultivierte und gewebsgebundene Zellen in unterschiedlichen dynamischen Funktionszuständen vorliegen, ist eine rein morphologisch-deskriptive Vergleichbarkeit der akquirierten Abbildungen zellulärer Oberflächen durchaus problematisch. Im folgenden werden exemplarisch die erzielten Auflösungsergebnisse anhand ausgewählter Zelloberflächen beschrieben, obgleich eine detaillierte Reproduzierbarkeit insbesondere bei den, im vitalen Funktionszustand untersuchten Zellen (siehe dort) auch an ein und derselben Zelle nicht möglich war, da sich die zeitliche Auflösung des Systems umgekehrt proportional zur räumlichen Auflösung verhält (siehe 3.1.4.2). Demzufolge ist für einen Scanvorgang der  $10\mu\text{m}^2$  einer Zelloberfläche hochauflösend und störungsfrei abbildet, erfahrungsgemäss eine Messzeit von ca. 15-20 Minuten nötig. Das vital intakte Zellen in dieser Zeit funktionsgebunden morphologische Veränderungen erfahren (z.B. Expression und Präsentation von funktionell relevanten Oberflächenproteinen wie Adhäsionsmolekülen bei Endothelzellen) steht außer Frage. Deshalb repräsentiert de facto die erste Zeile eines gescannten Bildes vitaler Zellen einen anderen zellulären Funktionszustand als die zuletzt akquirierte und

somit auch eine abweichende Morphe. Wir betrachten also im rasterkraftmikroskopisch generierten, statischen Bild vitaler Zelloberflächen ein Kontinuum funktionsgebunden morphologischer Veränderungen der Zelloberfläche über den Zeitraum des Scanvorganges. Das Dilemma der funktionellen Untersuchungen von beispielsweise Kanalproteinen mittels Rasterkraftmikroskopie wird durch den beschriebenen Sachverhalt plastisch unterlegt. Prinzipiell bietet die Rasterkraftmikroskopie die Möglichkeit molekulare Strukturen, wie ein Kanalprotein dreidimensional abzubilden, jedoch gelingt diese Hochauflösung nur dann, wenn die Scanfrequenz nicht zu hoch ist und folglich die Abbildungsdauer im Minutenbereich liegt. Funktionelle Veränderungen (z.B. funktionsassoziierte Bewegungen von Kanalproteinen) spielen sich jedoch im Millisekundenbereich ab, so dass die Detektion solcher dynamischer Veränderungen systembedingt nicht möglich ist. Alle hier, im folgenden präsentierten Abbildungen zellulärer Strukturen sind nach systematischer Optimierung der Mikroskopierparameter (Federkonstante des Cantilevers, Contact- vs. Non-Contact-, vs. Tapping-Mode, Scanfrequenz, Auflagekraft des Cantileversystems, Signalverstärkung u.s.w.) exemplarisch ausgewählt, um die prinzipiellen Auflösungsmöglichkeiten der Rasterkraftmikroskopie an kardiovaskulär relevanten Zellen zu verdeutlichen.

## 4.1 Immortale, bovine aortale Endothelzellen (BAEC)

### 4.1.1 Avitale Zellen

#### 4.1.1.1 Exsiccierte Zellen, Abbildung unter Raumbedingungen

BAEC wurden wie beschrieben auf CELLocate®-Objektträgern in 6-Well-Platten kultiviert, und nach Erreichen eines subkonfluenten Endothellayers aus den Kulturbedingungen entnommen. Der Mediumüberstand wurde abgesaugt und der Zellrasen zweimal mit PBS gespült. Anschließend wurden die Objektträger unter sterilen Kautelen in einen Exsikkator überführt und 6-8 Stunden getrocknet. Die AFM-Abbildung erfolgte also an avitalen Zellen bei Raumtemperatur und ohne Nutzung der Flüssigkeitszelle. Die Zellen wurden mit folgendem, mikroskopischen Setup abgebildet:

- |  |   |   |
|--|---|---|
| • Betriebsmodus                              | : | Contact-Mode                              |
| • Cantilever                                 | : | PSI-Microlever Typ D                      |
| • Ermittelte Federkonstante des Cantilevers  | : | 0,032 N/m                                 |
| • Scanfrequenz                               | : | 3-5 (= 3-5 Zeilen/s)                      |
| • Auflagekraft d. Cantilever-Messtip-Systems | : | ~ 12 nN                                   |
| • Messsignalverstärkung (z-Gain)             | : | 1,7                                       |
| • Messsignalverarbeitung                     | : | Topography-Mode                           |
| • Abbildungsareal                            | : | 100 $\mu\text{m}^2$ bis 4 $\mu\text{m}^2$ |

Nach lichtmikroskopischer Orientierung und Auswahl des Scanbereiches wurde zunächst ein Übersichtsscan von 100  $\mu\text{m}^2$  generiert. Anschließend wurde wie in Abbildung 40 gezeigt in eine repräsentative Region (ROI = region of interest) fokussiert. Man erkennt im Übersichtsbild das für endotheliale, subkonfluent gewachsene Zellen typische Bild des „Kopfsteinpflaster“-ähnlichen Zellrasens mit z.T. noch dendritischen Zellausläufern, die bei maximaler Konfluenz, d.h. komplettem, endothelialen Zell-Zell-Kontakt nicht mehr nachweisbar sind. Bei

Fokussierung in den zentralen, granulär strukturierten Bereich einer Endothelzelloberfläche erkennt man neben dem gut abzugrenzenden Zellkern deutlich eine Zellkernmembran und ein perinukleär retikuläres, feingranuläres Muster, welches am ehesten dem Golgi-Apparat und den perinukleären Zysternen des endoplasmatischen Retikulums entsprechen dürfte. Eine klare Abgrenzung dieser Strukturen gegenüber zytoskelettalen- und Zellmembranbestandteilen ist jedoch rein morphologisch nur schwer möglich. Prinzipiell sei nochmals darauf hingewiesen, dass die Rasterkraftmikroskopie die hochauflösende Abbildung von

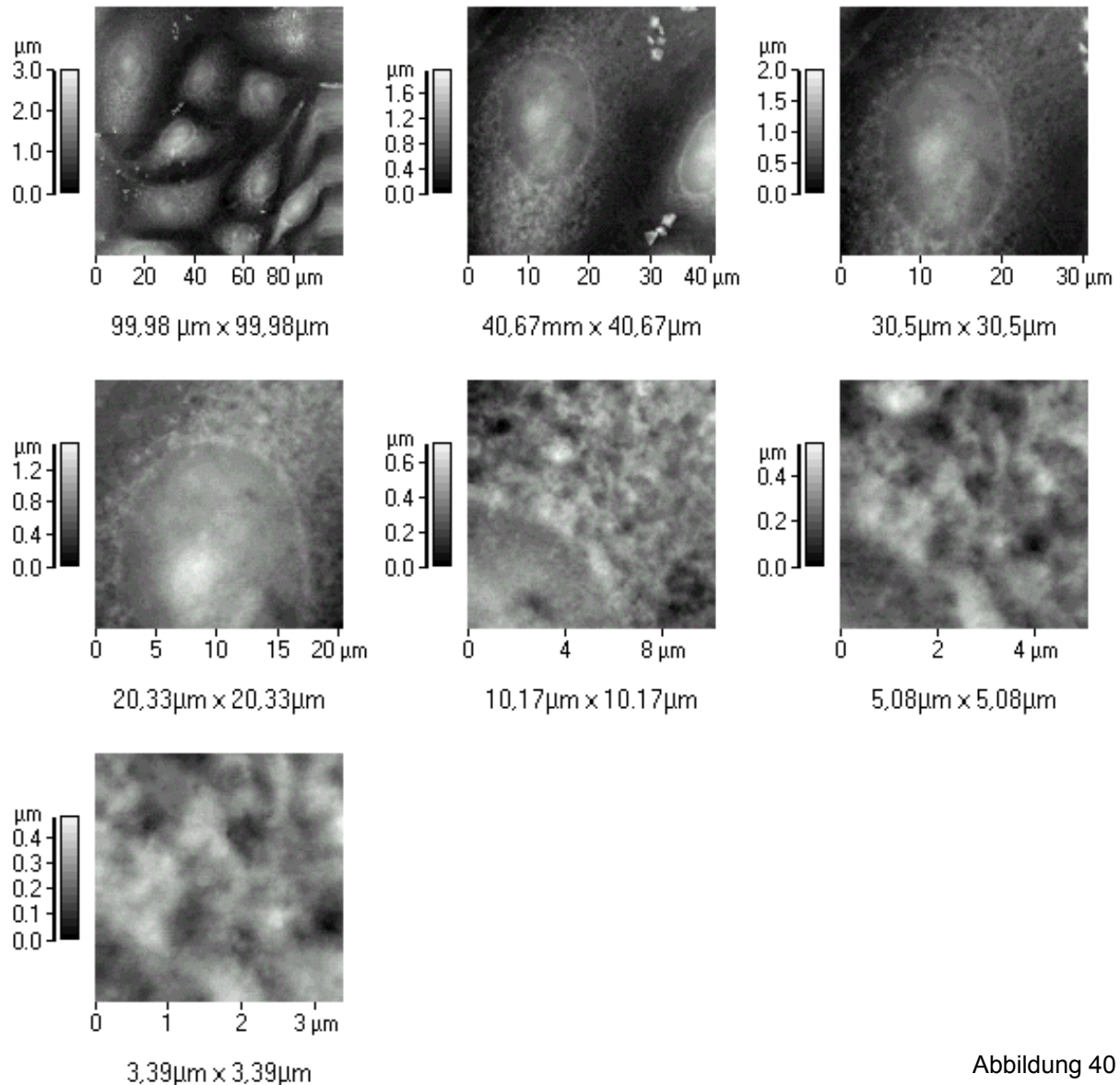


Abbildung 40

Oberflächenstrukturen erlaubt, d.h. an intakten Zellen sind de facto nur Zellmembranbestandteile detektier- und abbildbar. Aufgrund der Tatsache, dass die hier abgebildeten Zellen im Exsikkator dehydriert wurden, ist es möglich, dass sich intrazelluläre Strukturen durch die Zellmembranoberfläche hindurch „demaskieren“ und somit wie gezeigt sichtbar werden. Prinzipiell ist eine dezidierte Unterscheidung von zellulär-molekularen Oberflächenstrukturen nur immunhistologisch möglich. Auch hierbei kommen zunehmend neben den etablierten Fluoreszenz- und radioaktiv-markierten, sterisch markierte (Gold-Labeling am Fc-Teil des Antikörpers) Antikörper zum Einsatz. Letztere erlauben eine sehr genaue Lokalisationsdiagnostik

und Quantifizierung der jeweiligen markierten Membranproteine mittels Rasterkraftmikroskopie. Die hier untersuchten BAEC zeigten bis zu einer Scanbereichsgröße von  $\sim 3\text{-}4\ \mu\text{m}^2$  gut abgrenzbare Strukturen. Bei weiterer Fokussierung „verschwamm“ die laterale Auflösung, so dass unter diesen Versuchsbedingungen keine höhere Auflösung zu erzielen war.

#### 4.1.1.2 Exsiccierte Zellen, Abbildung unter zellphysiologischen Bedingungen bei 37°C

BAEC wurden wie o.b. kultiviert und präpariert. Die AFM-Abbildung erfolgte also an avitalen Zellen, jetzt allerdings bei 37°C und unter Nutzung der Flüssigkeitszelle. Als zellphysiologisches Medium während der rasterkraftmikroskopischen Untersuchung wurde PBS benutzt. Die Zellen wurden mit folgendem mikroskopischen Setup abgebildet:

• Betriebsmodus	:	Contact-Mode
• Cantilever	:	PSI-Microlever Typ C
• Ermittelte Federkonstante des Cantilevers	:	0,016 N/m
• Scanfrequenz	:	1,5 (= 1,5 Zeilen/s)
• Auflagekraft d. Cantilever-Messtip-Systems	:	$\sim 4\text{-}5\ \text{nN}$
• Messsignalverstärkung (z-Gain)	:	1,5
• Messsignalverarbeitung	:	Topography-Mode
• Abbildungsareal	:	$100\ \mu\text{m}^2$ bis $1,6\ \mu\text{m}^2$

Nach lichtmikroskopischer Orientierung und Auswahl des Scanbereiches wurde wieder zunächst ein Übersichtsscan von  $100\ \mu\text{m}^2$  generiert. Anschließend wurde wie in Abbildung 41 gezeigt in eine repräsentative ROI fokussiert. Man erkennt, wie bereits beschrieben, im Übersichtsbild das für endotheliale, subkonfluent gewachsene Zellen typische Bild des „Kopfsteinpflaster“-ähnlichen Zellrasens mit z.T. noch dendritischen Zellausläufern. Wie unter 4.1.1.1 beschrieben sind an diesen avitalen, im Exsikkator dehydrierten, jetzt aber unter zellphysiologischen Bedingungen abgebildeten Zellen, Strukturen des Zellkerns, der Zellkernmembran, des endoplasmatischen Retikulums und Zytoskeletts verifizierbar. Im Vergleich zur Abbildung unter Raumbedingungen zeigt sich jetzt eine höhere Auflösung bis in den Bereich von  $1,6\ \mu\text{m}^2$  (Abbildung 41). Bei noch höherer lateraler Auflösung ( $0,8\ \mu\text{m}^2$ ) waren keine klaren Strukturen mehr abgrenzbar (Abbildung 42). Im Vergleich zu den Versuchen unter Raumbedingungen fanden wir bei diesem Versuchsansatz, dass die Zellen der mechanischen Alteration durch den Scanvorgang im Contact-Mode bei höheren Auflagekräften des Cantilever-Tip-Systems nicht widerstanden und sich vom Objektträger lösten oder von der atomar spitzen Messnadel zerstört wurden. Deshalb versuchten wir zunächst durch die Wahl eines Cantilevers mit geringerer Federkonstante dieses Problem zu lösen. Mit diesen „weichen“ Cantilevern (hohe Verwindungsinstabilität, Federkonstanten  $\sim 0,10\ \text{N/m}$ ) gelang selten eine stabile Annäherung an die Zelloberfläche und bei hohen Scanfrequenzen eine zufriedenstellende Auflösung, so dass wir nach systematischer Optimierung mit den o.g. Scanparametern die beste Abbildungsqualität erzielten. Bei weiterer Reduktion der Auflagekraft des Messsystems war eine kontinuierliche Datenakquirierung nicht möglich, da die Messnadel von der zu untersuchenden Oberfläche abriss und folglich kein Messsignal generiert werden konnte. Im Non-Contact-Mode waren trotz maximaler Messsignalverstärkung keine hochauflösenden Scans generierbar. Die Möglichkeiten des Tapping-Mode (Intermittent-Contact-Mode) standen uns zum

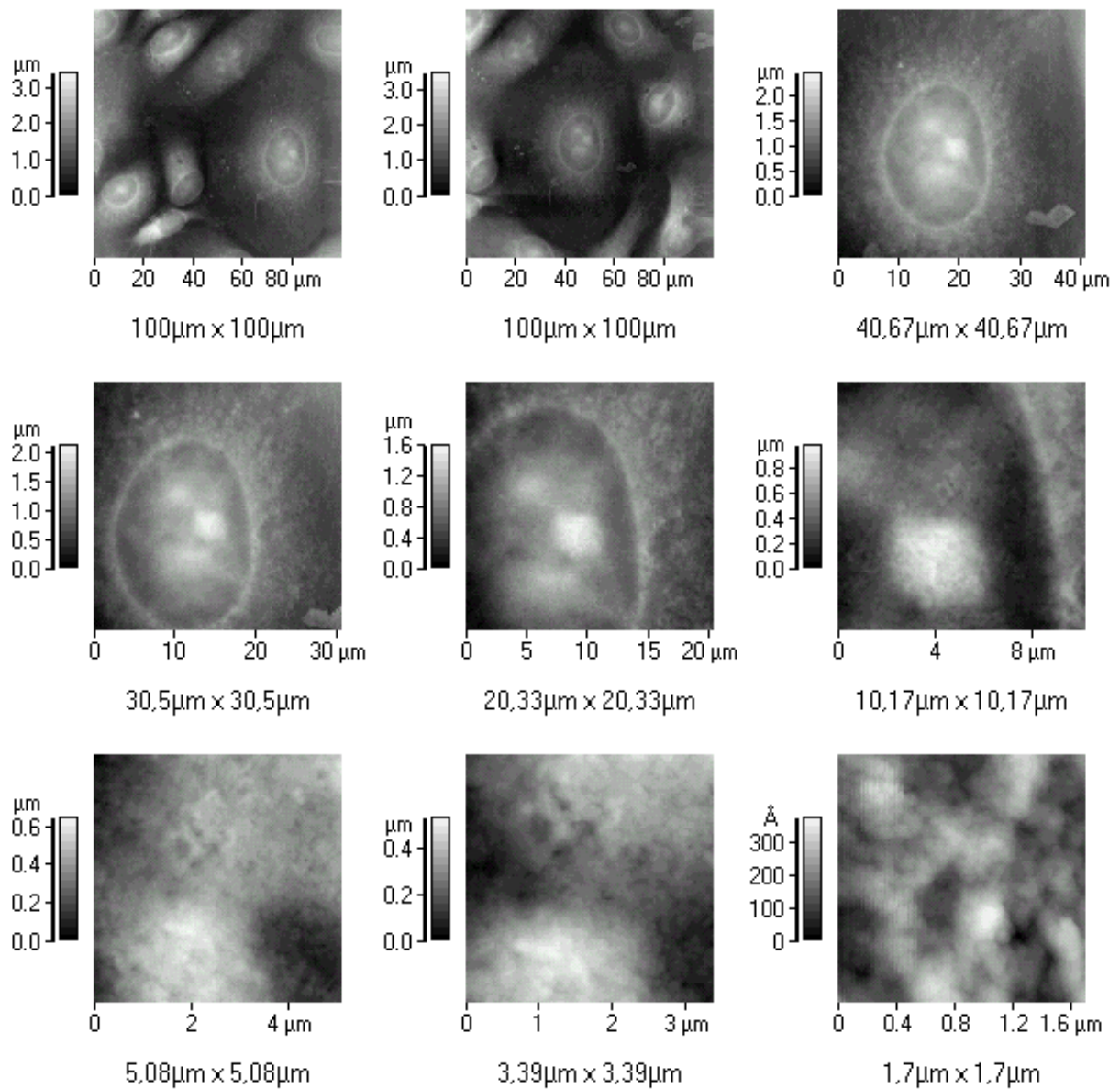


Abbildung 41

Zeitpunkt dieser präliminären Versuchsansätze gerätetechnisch nicht zur Verfügung und wurde durch eine Software-Erweiterung des Autoprobe CP-Mikroskops erst später realisiert.

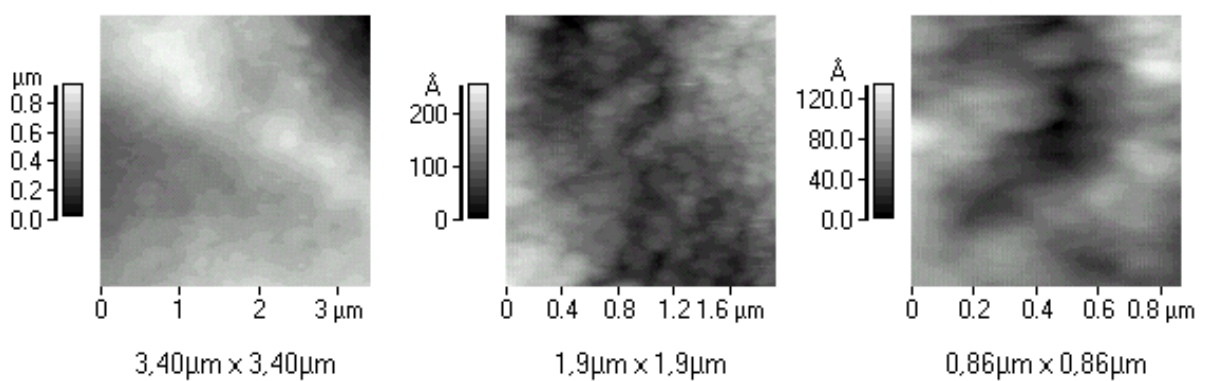


Abbildung 42

Die Abbildungen 43 und 44 zeigen exemplarisch die dreidimensionale Darstellung der rasterkraftmikroskopisch untersuchten BAEC-Zelloberflächen.

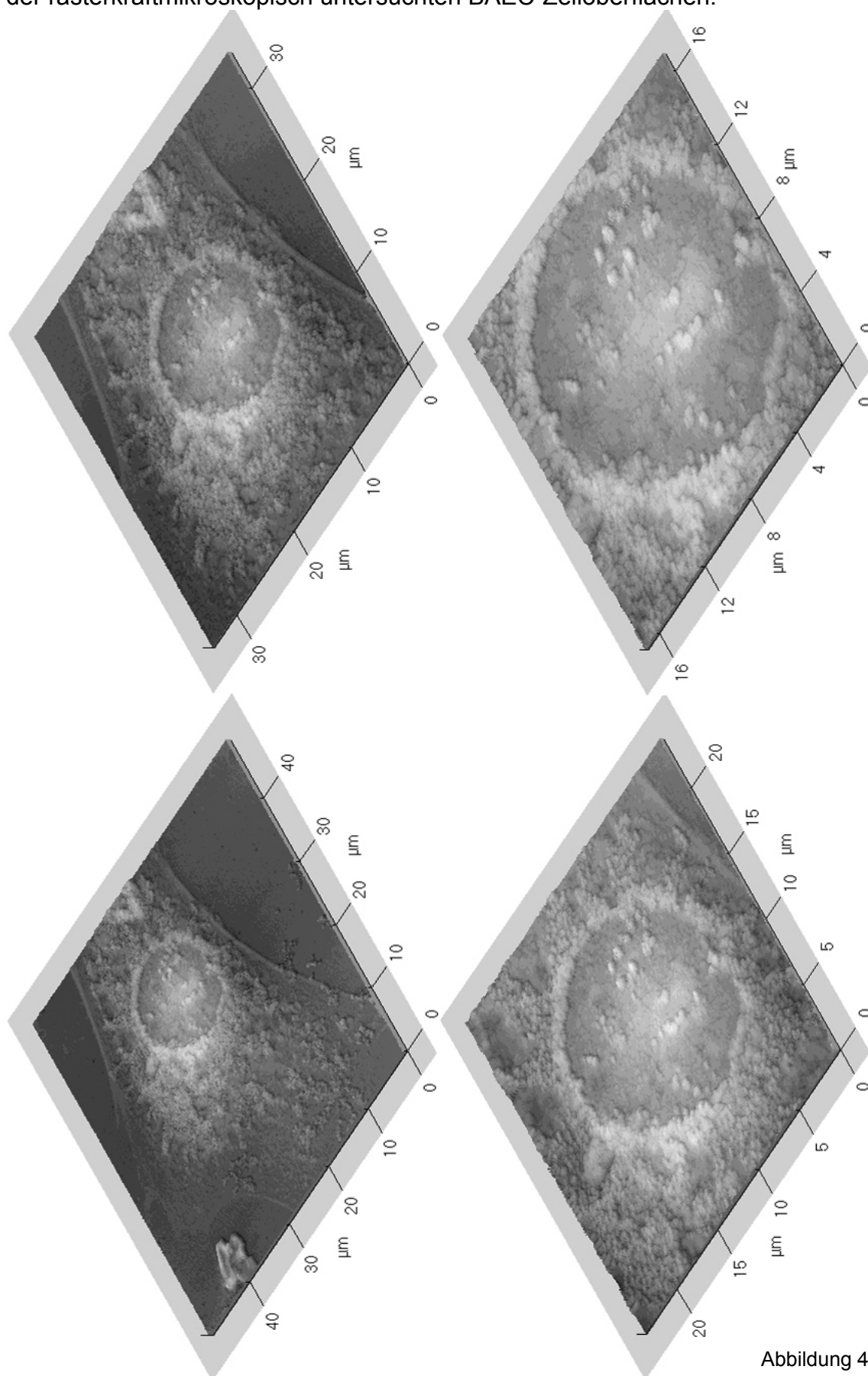


Abbildung 43



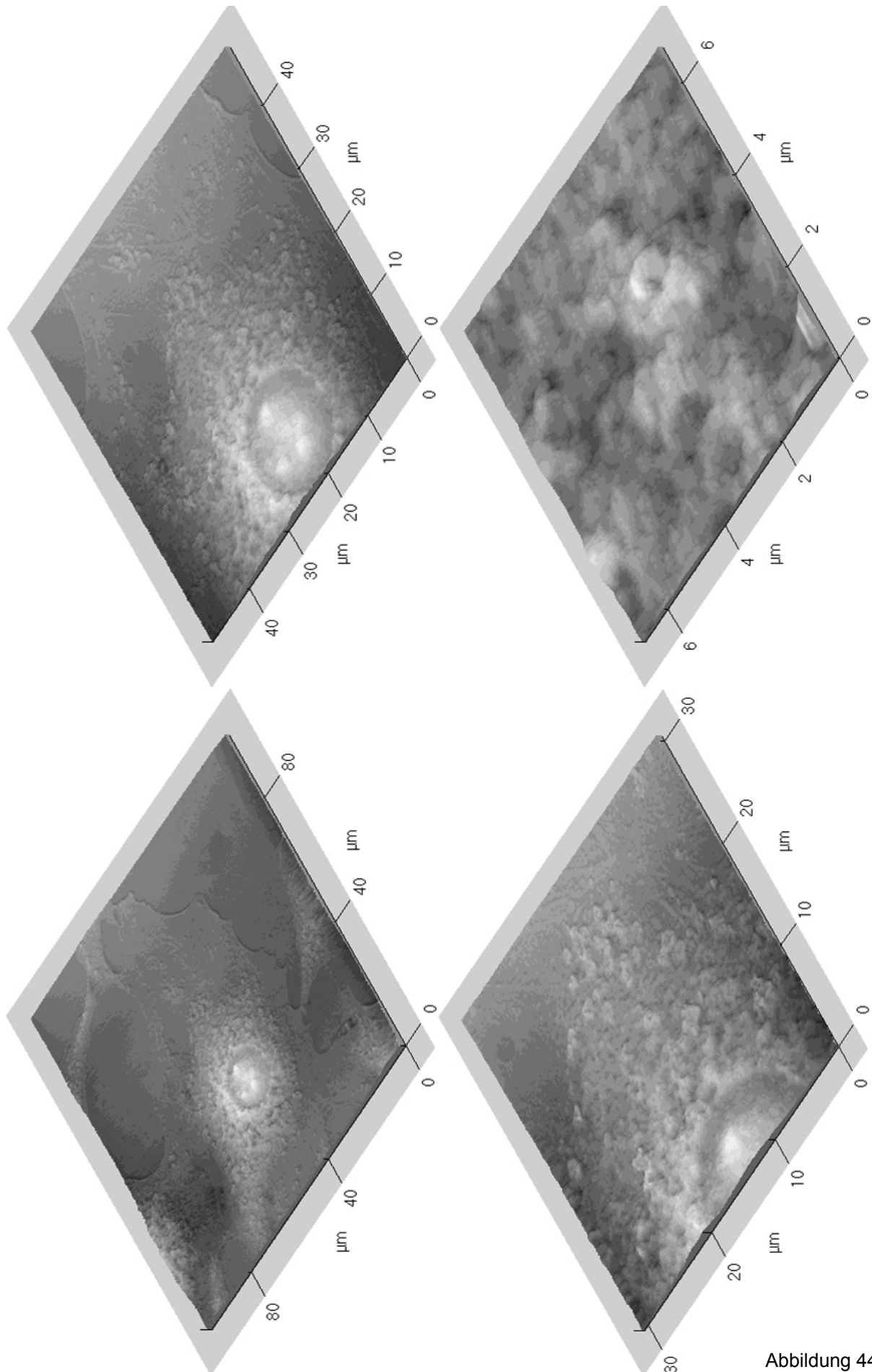


Abbildung 44

In Abbildung 45 ist dokumentiert, dass anhand der dreidimensional generierten Topografie-Bilder der Zelloberflächen eine sehr genaue, softwaregestützte Analyse der Zellstrukturdimensionen durchführbar ist. Hieraus ergibt sich die analytische Möglichkeit der Rasterkraftmikroskopie, die ermittelten Strukturdaten zellulärer Bestandteile mit denen zu vergleichen, die mittels anderer hochauflösender Methoden (z.B. REM) ermittelt wurden. Somit kann die Rasterkraftmikroskopie als mikroskopische Referenzmethode, insbesondere bei der Darstellung vitaler Zellen dienen. In Anbetracht dieser Option ist es nicht unerheblich zu erwähnen, dass beispielsweise elektronenmikroskopisch gewonnene Strukturdaten maßgeblich von methodisch bedingten Fixationsartefakten beeinflusst werden und die elektronenmikroskopische Darstellung lebender Strukturen in physiologischer Umgebung nicht möglich ist. Eine neue Methode der Elektronenmikroskopie, die ESEM (ESEM = environmental scan electron microscopy) vermag ausschließlich hydrierte, aber nicht vitale Proben zu untersuchen. Subsummierend ergibt sich hinsichtlich solcher Fragestellungen ein klarer Vorteil des rasterkraftmikroskopischen Vorgehens gegenüber anderen hochauflösenden mikroskopischen Methoden.

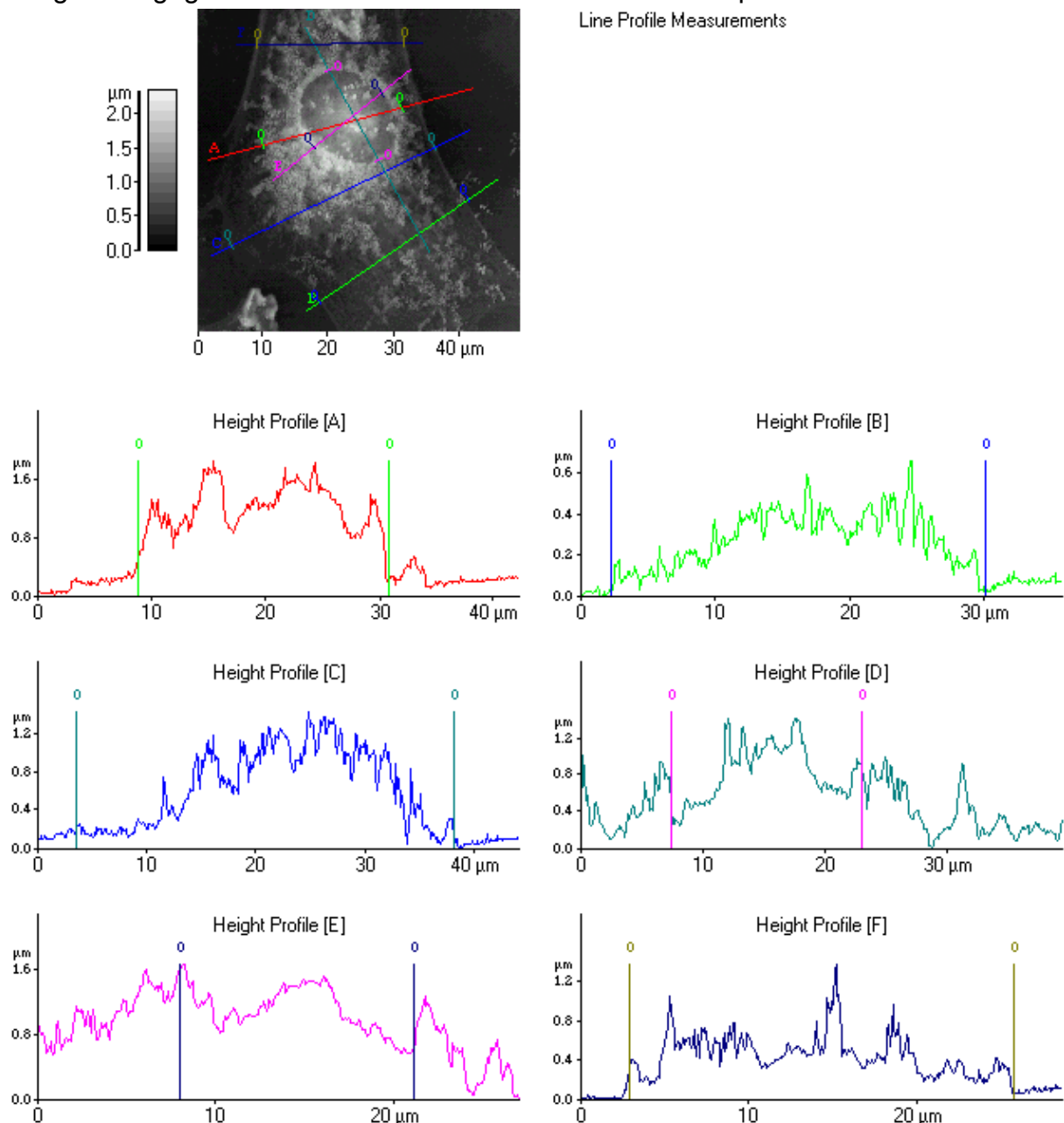


Abbildung 45



#### 4.1.2 Vitale Zellen

Nachdem es uns nach Optimierung der Zellpräparation und des instrumentellen Setups gelungen war, dehydrierte bzw. fixierte (Glutardialdehyd) BAEC reproduzierbar unter zellphysiologischen Bedingungen (zellphysiologisches Puffersystem, 37°C) mittels Rasterkraftmikroskopie hochauflösend abzubilden, bestand die eigentliche Herausforderung darin, die „Atomic Force Microscopy“ an vitalen, weder dehydrierten noch glutaraldehyd-fixierten noch anderweitig vorbehandelten Zellen zu etablieren. Zunächst versuchten wir, die aus den o.b. Versuchsansätzen gewonnenen Erfahrungen bei der rasterkraftmikroskopischen Untersuchung vitaler BAEC heranzuziehen. Die Fluidität einer Zellmembran unfixierter Zellen implizierte, das möglicherweise die im Contact-Mode auftretenden Lateralkräfte während des Scanvorganges die zu untersuchende Probe massiv alterieren könnten. Trotz intensiver Bemühungen und systematischer Modifikation aller Scanparameter gelang es im Contact-Mode zu keiner Zeit reproduzierbare Abbildungen von Membranoberflächenstrukturen vitaler Zellen zu generieren. Im Non-Contact-Mode war es unter den Bedingungen der Flüssigkeitszelle (also bei Messungen in zellphysiologischem Medium) zwar möglich die Zelloberflächen ohne größere mechanische Alteration durch die Messspitze abzuscannen, jedoch war das Messsignal trotz maximaler elektronischer Verstärkung unzureichend, um kontrastreiche mikroskopische Abbildungen zu erzielen (siehe 3.1.9). Insbesondere durch die Arbeitsgruppe von Radmacher und deren Publikationen über die visko-elastischen Eigenschaften vitaler Thrombozyten inspiriert<sup>63</sup>, gelangten wir zu der heutzutage etablierten Erkenntnis, dass die hochauflösende Abbildung von Membranoberflächen intakter, vitaler Zellen nur durch den Einsatz des sogenannten und unter 3.1.9 bereits beschriebenen Tapping-Mode möglich ist. Nach Etablierung dieses Messmodus im instrumentellen Setup unseres Mikroskops begannen wir zunächst die bereits durchgeführten Versuchsreihen an fixierten Zellen unter Verwendung des Tapping-Mode zu reproduzieren, was relativ unproblematisch gelang. Dennoch ergaben sich erneut Probleme bei der Anwendung dieser neuen Technologie an vitalen Zelloberflächen. Das Problem des Tapping-Mode ergibt sich daraus, dass das Messsignal durch die Interaktion des oszillierenden Cantilever-Tip-Systems mit der Objektoberfläche entsteht. D.h., dass die interatomaren Wechselwirkungen sowohl die Schwingungsamplitude, als auch die Anregungsfrequenz des Cantilever-Tip-Systems beeinflussen, man aber nur einen der beiden Parameter (zumeist Amplitudenshift) als Messsignalveränderung detektiert. Die optimale Anregungsfrequenz und Schwingungsamplitude des Cantilever-Tip-Systems für den jeweiligen Abbildungsvorgang herauszufinden, ist computerassistent an Festkörpern und auch im schwingungsdämpfenden Untersuchungsmedium (z.B. Zellkulturmedium) unproblematisch. Dies zeigten uns Versuche, in denen beispielsweise Siliziumkristalle unter den Bedingungen ionischen Mediums rasterkraftmikroskopisch untersucht wurden. Selbst an glutaraldehyd-fixierten Zelloberflächen gelang es regelmäßig, Tapping-Mode-AFM unter zellphysiologischen Bedingungen zu vollziehen. Erst durch die Publikation von Putman et al.<sup>92</sup> wurde klar, dass nur sehr hohe Tapping-Mode-Anregungsfrequenzen für die Abbildung unfixierter, fluider Zellmembranen erfolgsversprechend sind. In Kenntnis dieser Tatsache wählten wir steifere Cantilever mit einer höheren Federkonstante (0,1 – 0,3 N/m) die Anregungsresonanzfrequenzen bis 100 kHz ermöglichten. Hiermit gelang es, bei im folgenden genannten Scanparametern vitale

BAEC reproduzierbar rasterkraftmikroskopisch zu untersuchen und hochauflösend abzubilden.

• Betriebsmodus	:	Tapping-Mode
• Cantilever	:	PSI-Microlever Typ E / F
• Ermittelte Federkonstante des Cantilevers	:	0,15 N/m / 0,62 N/m
• Scanfrequenz	:	0,5 (= 0,5 Zeilen/s)
• Anregungsfrequenz des Cantilevers	:	40 - maximal 110 kHz
• Auflagekraft d. Cantilever-Messtip-Systems	:	~ 0,25 nN
• Messsignalverstärkung (z-Gain)	:	2,5 - 3,0
• Messsignalverarbeitung	:	Topography-Mode
• Abbildungsareal	:	100 $\mu\text{m}^2$ bis 90 $\text{nm}^2$

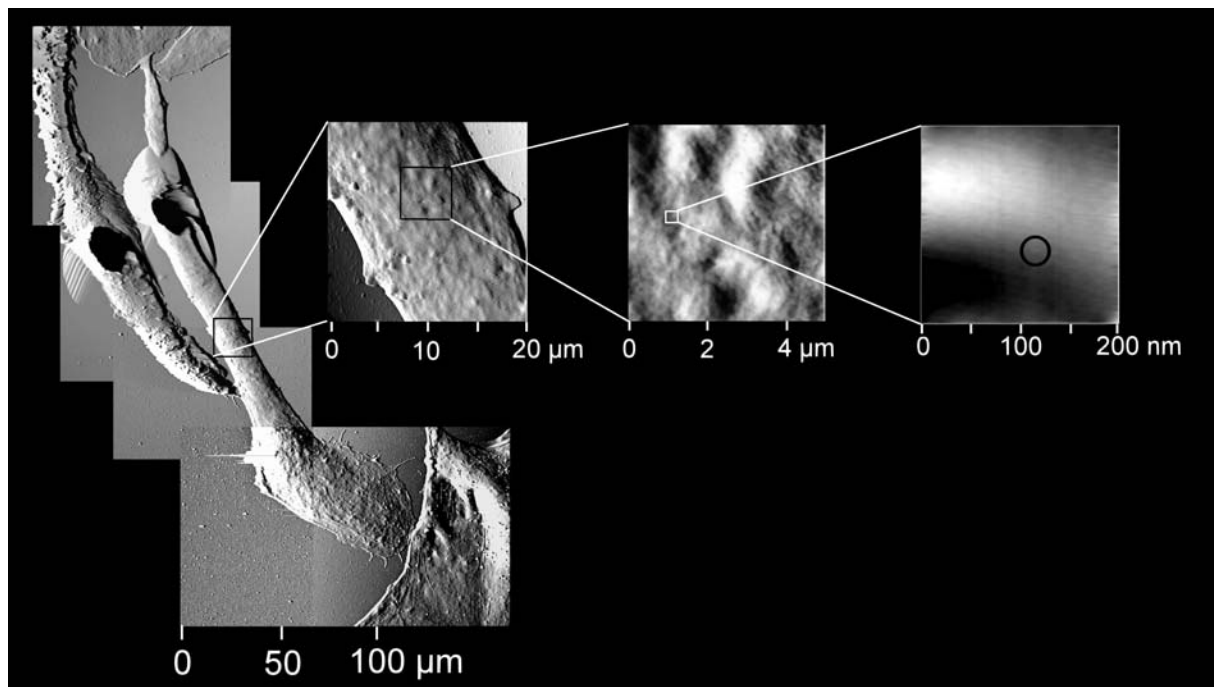


Abbildung 46

In Abbildung 46 ist Membranoberfläche des dendritischen Teils einer BAEC abgebildet. Bei Fokussierung in die abgebildete ROI erkennt man ein feingranuläres Muster auf der Membranoberfläche. Zytoskelettale und intrazelluläre Strukturen demarkieren sich bei diesen funktionell intakten Zellen nicht so ausgeprägt, wie bei den fixierten und dehydrierten Zellen. Außerdem ist festzustellen, dass im Auflösungsbereich von 200  $\text{nm}^2$  nur noch flau, unscharfe Strukturen abbildbar sind. Größenordnungsorientiert ist dies der Bereich komplexer Membranproteine. In Abbildung 47 ist ein zusammengesetzter Bildausschnitt mehrerer 100  $\mu\text{m}^2$  großer Scanareale gezeigt. Hierbei sieht man sehr deutlich, wie konfluent die BAEC gewachsen sind und kann interzellulär junctionale Strukturen (gap junction) sehr gut identifizieren. Bei Fokussierung im Bereich dieser junctionalen Strukturen sind im Auflösungsbereich von 5  $\mu\text{m}^2$  tubuläre Konfigurate zu erkennen, die bei weiterer Vergrößerung nicht detaillierter auflösbar sind, da durch ein Störsignal (horizontale und vertikale periodische Streifen) ein, für die Abbildung ungünstiges Signal-Rausch-Verhältnis entsteht, welches das generierte Bild artifiziell überlagert. Auch hier findet sich ein feingranuläres Muster auf der Zellmembranoberfläche, welches am ehesten komplexen strukturellen Membranproteinen entsprechen könnte. Hier sind

immunhistologische Marker unerlässlich, um diesbezüglich definitive Aussagen treffen zu können.

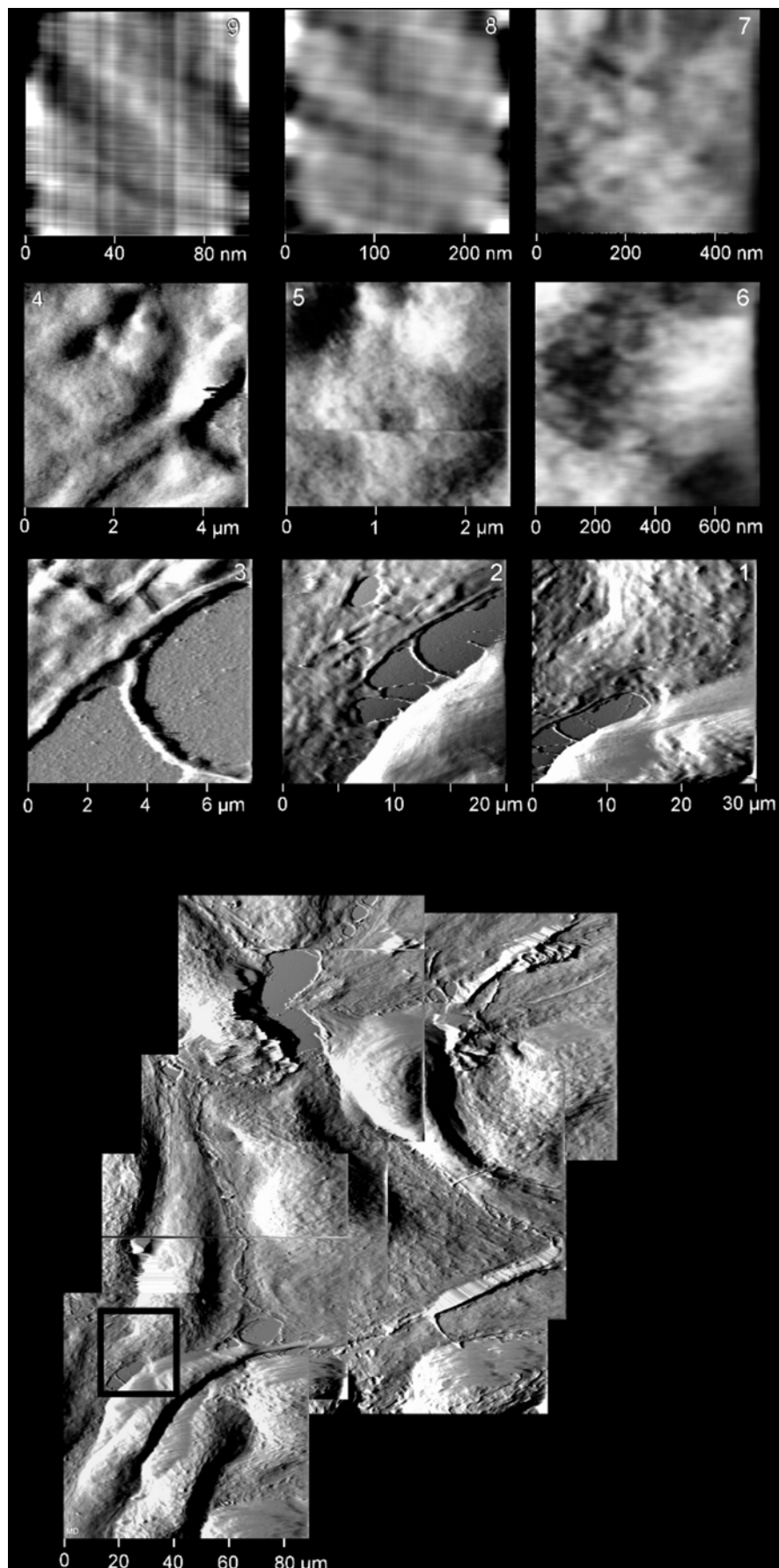


Abbildung 47

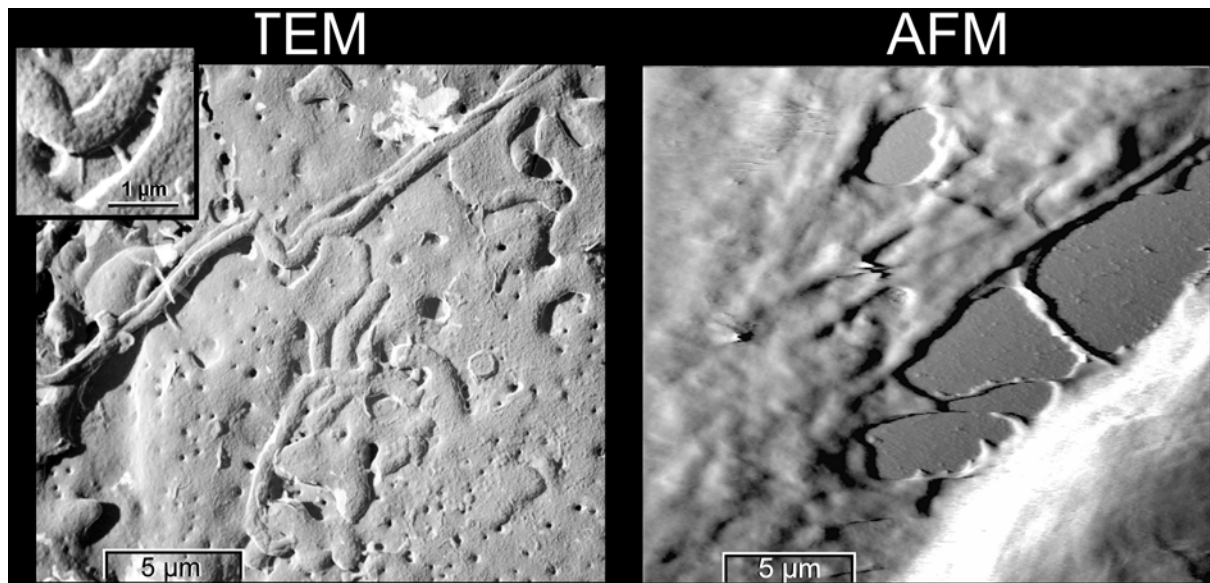


Abbildung 48

Um zu verifizieren, ob die interzellulär- junktionalen, tubulären Strukturen aus Abbildung 47 auch mittels einer mikroskopischen Referenzmethode detektierbar sind präparierte Herr Dr. M. Drechsler die BAEC (Gefrierbruchtechnik) für eine Untersuchung mittels TEM (Transmissions-Elektronenmikroskopie), welche wir im Institut für Anatomie der Charité (Campus Mitte) durchführten. Hierbei zeigt sich morpho-analytisch eine erstaunliche Übereinstimmung zwischen den rasterkraftmikroskopisch und elektronenmikroskopisch untersuchten subzellulären Strukturen.

#### 4.1.2.1 biophysikalische Elastizitätsmessungen

Neben den rein morpho-analytischen Optionen, die ein Rasterkraftmikroskop bietet, beschrieben diverse Arbeitsgruppen (Hansma et al., Radmacher et al.) die Möglichkeit, das AFM als sogenannten „Nanoindentator“, d.h. als ein Werkzeug zu benutzen, das es erlaubt, biophysikalische Elastizitätsmessungen an Biomembranen durchzuführen. Der theoretische Hintergrund für diese Messungen ist unter 3.1.9.1 ausführlich beschrieben. Wir führten routinemäßig nach jeder Abbildung vitaler BAEC lokale Elastizitätsmessungen an folgenden vier Zelloberflächenregionen durch:

- Zellmembran über dem Zellkernareal
- Zellmembran perinukleär
- Zellmembran über dem „Zellkorpus“
- Zellmembran im Bereich dendritischer Ausläufer

Die vier verschiedenen Messpunkte an denen jeweils 100 Kraft-Abstands-Kurven akquiriert wurden, sind in Abbildung 49 markiert. Anhand der dazugehörigen, gemittelten Kraft-Abstands-Kurven (n=100) ist zu erkennen, dass es regionale Elastizitätsunterschiede zwischen den Messpunkten gibt. Bei konstanter Federkonstante des Cantilevers ist die Kraft-Abstands-Beziehung nur von der Elastizität der untersuchten Oberfläche abhängig. D.h., dass an Messpunkten mit geringerer Elastizität (Kurve 1 und 2 in Abbildung 49) ein fast linearer Zusammenhang zwischen vertikaler Scannerauslenkung (und konsekutiver Deflektion des Cantilevers) und resultierender Kraft besteht. Der initial

hyperbelförmige Verlauf des Graphen der Kraft-Abstands-Kurve nach Nulldurchgang (Kontakt- oder „snap-in“- point) definiert die visko-elastische Indentation. Je protrahierter der hyperbelförmige Abschnitt dieser Kurve verläuft, umso größer ist die Indentation („Eindrückbarkeit“) der untersuchten Oberfläche. Demzufolge lässt sich zusammenfassen, dass im Bereich des Zellkerns und perinukleär eine größere Indentation nachweisbar ist als im Bereich zytosolischer Ausläufer. Insbesondere die Arbeitsgruppe Radmacher hat diese visko-elastischen Messungen soweit perfektioniert, dass an jedem Bildpunkt des generierten Topografie-Scans (maximal 512x512 Bildpunkte) Kraft-Abstands-Beziehungen untersucht werden konnten und somit ein Mapping der visko-elastischen Eigenschaften des gesamten Scanareals möglich wurde. Radmacher et al. untersuchten die visko-elastischen Veränderungen an humanen Thrombozyten vor und nach Aktivierung und sahen, dass funktionelle Veränderungen des Thrombozyten mit Veränderungen der Verteilung der visko-elastischen Eigenschaften der Zellen einhergehen<sup>93</sup>.

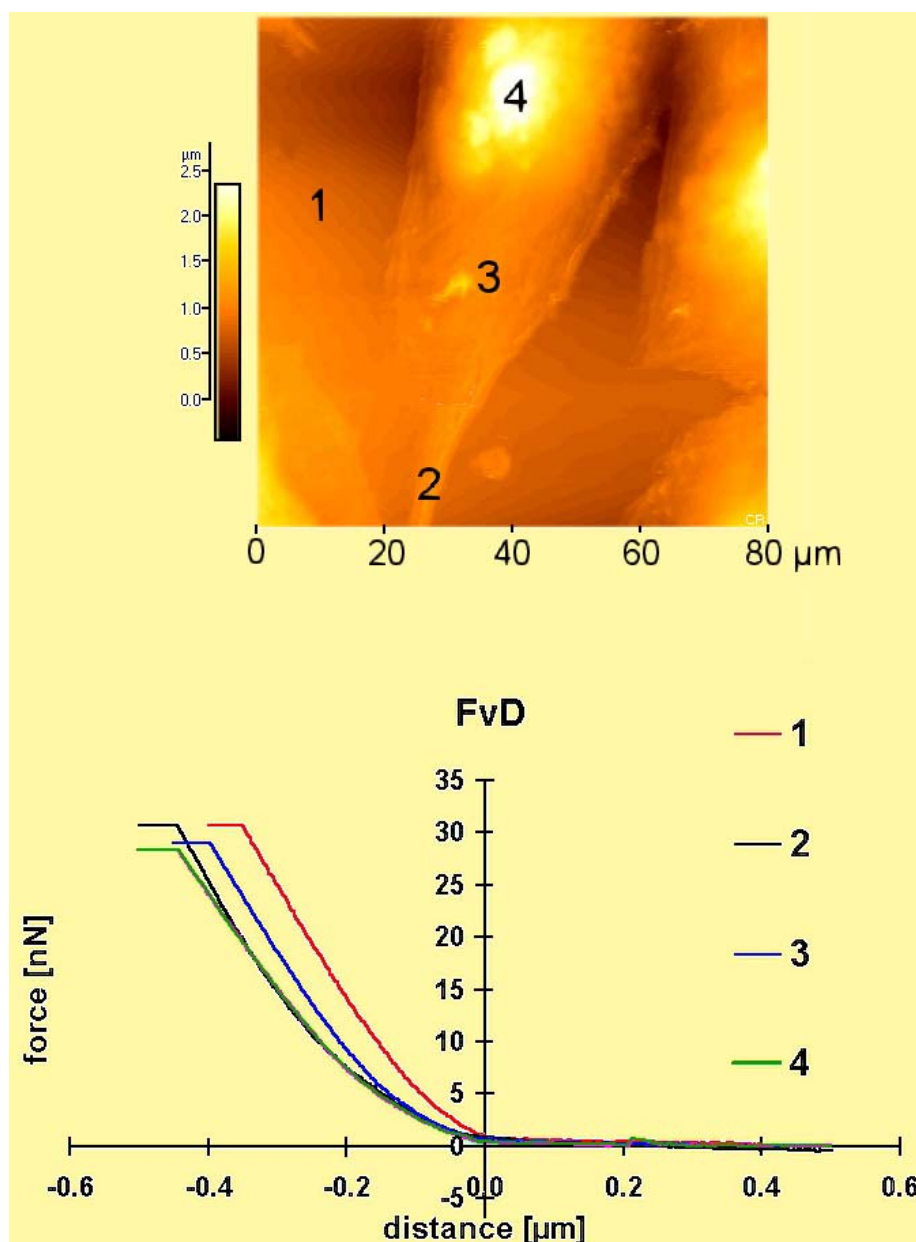


Abbildung 49



Nach Präparation und spezifischer Probenfixation (siehe 3.2.2) wurde die luminale (endotheliale) Oberfläche der Aorta rasterkraftmikroskopisch in physiologischem 37°C- temperierten, PBS-Medium bei kontinuierlicher Mediumperfusion mit 0,2 ml/min innerhalb der Flüssigkeitskammer untersucht. Die Einstellungen am Mikroskop waren hierbei folgende:

- Betriebsmodus : Tapping-Mode
- Cantilever : PSI-Microlever Typ F
- Ermittelte Federkonstante des Cantilevers : 0,71 N/m
- Scanfrequenz : 0,3 (= 0,3 Zeilen/s)
- Anregungsfrequenz des Cantilevers : 80 - maximal 110 kHz
- Auflagekraft d. Cantilever-Messtip-Systems : ~ 0,25 nN
- Messsignalverstärkung (z-Gain) : 2,5 - 3,0
- Messsignalverarbeitung : Topography-Mode
- Abbildungsareal : 40  $\mu\text{m}^2$  bis ~ 1  $\mu\text{m}^2$

Die o.b . Gewebspräparation wurde vollständig unter physiologischen Bedingungen (im temperierten Medium) vollzogen, um zu gewährleisten, dass die Gewebszellen intakt bleiben. Nach initial erheblichen, präparatorischen Problemen (schwierige Fixation der longitudinal inzidierten Aorta auf dem Probenhalter) benötigten wir ca. 5 min vom Zeitpunkt der Tötung des Tieres und Entnahme der Aorta bis zum Beginn der mikroskopischen Abbildung. Allerdings gelangen verwertbare AFM-Scans ausschließlich bei sehr niedrigen Scanfrequenzen, weshalb die rasterkraftmikroskopische Datenakquirierung pro Abbildung ca. 35 Minuten in Anspruch nahm. Aus diesem Grund war es notwendig, die Flüssigkeitszelle kontinuierlich mit Medium zu perfundieren, ohne durch die perfusionsbedingte Strömung des Mediums den Abbildungsprozess zu beeinflussen. Eine Perfusionsgeschwindigkeit von 0,2 ml/min erwies sich hierbei als ausreichend, um die Osmolarität des PBS-Mediums über die Dauer des Messvorganges stabil zu erhalten, ohne das detektierbare perfusionsbedingte Messartefakte auftraten. Wir fanden an den endothelialen, gewebsgebundenen Zellen eine erstaunlich gute Abgrenzbarkeit der Einzelzellen voneinander. Das Zellbild entspricht dem Bild endothelialer Zellverbände, wie es aus Zellkulturverbänden von vaskulären Endothelien (z.B. BAEC) bekannt ist. Außerdem meint man, im Gegensatz zu den unter Kulturbedingungen gewachsenen Zellen, hier im intakten Zellverband des Aortenendothels, eine Ausrichtung der Zellen entlang der Strömungsrichtung des Blutes zu erkennen. Diesen Effekt der strömungsinduzierten Zellausrichtung sahen wir in unserer Arbeitsgruppe regelmäßig bei Experimenten an kultivierten pulmonalen Gefäßendothelzellen, an denen die schubspannungsinduzierte endotheliale Mediatorenfreisetzung gemessen wurde<sup>94,95</sup>. Außerdem untersuchte die AFM-Arbeitsgruppe um Barbee dieses Phänomen systematisch und fand, dass bestimmte Strukturproteine erst bei definierten Schubspannungen exprimiert werden („shear stress induced regulation“)<sup>96,97</sup>. Zusätzlich lassen sich feingranuläre Oberflächenstrukturen (Proteine?) detektieren, die in vergleichbarer Größe auch an den untersuchten BAEC-Kulturen nachweisbar sind. Im Gegensatz zur Kaninchenaorta gelang die hochauflösende Darstellbarkeit struktureller Einheiten des endothelialen Zellverbandes bei unverändertem Setup sowohl an der Aorta des Kaninchens, als auch an der Rattenaorta nur unbefriedigend. Schon die Positionierung der Messspitze auf der Endotheloberfläche gestaltete sich an diesen Präparaten außerordentlich kompliziert. Trotz vielfältiger Modifikationen des präparatorischen und mikroskopischen Setups gelingt es an diesen gewebsgebundenen Endothelzellverbänden nicht eine artefaktfreie rasterkraftmikroskopische Abbildung zu generieren. Auch die Abgrenzbarkeit der

Einzelzellen des Zellverbandes voneinander gelingt nur unzureichend. Dennoch erkennt man wiederum feingranuläre Oberflächenstrukturen, die jedoch aufgrund der erheblichen scan-bedingten Artefakte (Streifen und „Kratzer“) nicht sicher zellulären

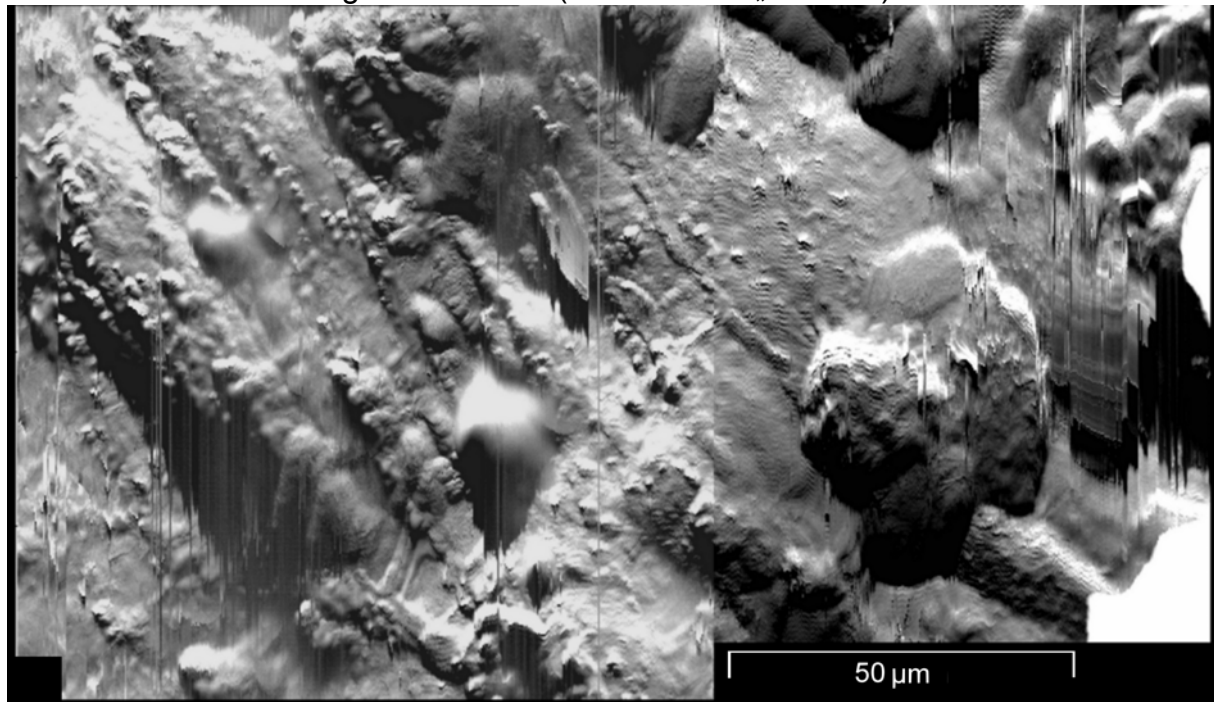


Abbildung 51  
Endotheliale Oberfläche der Aorta thoracalis des Kaninchens

Strukturen zuordnenbar sind. In Anlehnung an die Publikation von Putman et al.<sup>98</sup>, versuchten wir mit sehr hohen Tapping-Anregungsfrequenzen (>120 kHz) eine „Stabilisierung“ des zu untersuchenden Endothelzellverbandes zu erreichen. Hierbei war jedoch zu verzeichnen, dass die Annäherung („Landung“) der Messspitze auf der Endotheloberfläche zwar ohne größere Probleme gelang, jedoch meist schon während der ersten horizontalen Scanbewegung das Messsignal verloren ging und der, die Messspitze tragende Federbalken, lichtmikroskopisch sichtbar von der Objektoberfläche abriss und verstärkt oszillierte. Die genauere Untersuchung des Cantilever-Tip-Systems nach solchen Ereignissen ergab, dass an der Messspitze Zellreste nachweisbar waren, die ihrerseits die Schwingungseigenschaften des Cantilevers massiv beeinflussten, so dass die ursprüngliche Tapping-Anregungsfrequenz nicht mehr reproduzierbar war. Es bleibt zu vermuten, dass die Anwendung sehr hoher Tappingfrequenzen, wie in der Arbeit von Putman beschrieben, fluide und sehr weiche Oberflächen formell besser rasterkraftmikroskopisch untersuch- und abbildbar macht („Aushärtungseffekt“ der Zellen durch hohe Tapping-Frequenz), allerdings die, durch das Messsystem applizierte Energie auf die Zelloberfläche offensichtlich Ausmaße annimmt, die eine massive Alteration bzw. Destruktion der Zellen durch das Messsystem induziert. Demzufolge ergibt sich auch hierbei die Notwendigkeit, eine optimale Kombination aus möglichst hoher Anregungsfrequenz bei noch nicht destruierend wirkender Anregungsenergie des Cantilever-Tip-Systems für den entsprechenden Zelltyp zu finden. Trotz vielfältiger Modifikationen unseres mikroskopischen Setups gelang dies an den Endothelzelloberflächen der Rattenaorta und der Kaninchenaorta nur unzureichend, was die artefaktüberlagerten Abbildungen 51, 52 und 53 dokumentieren.



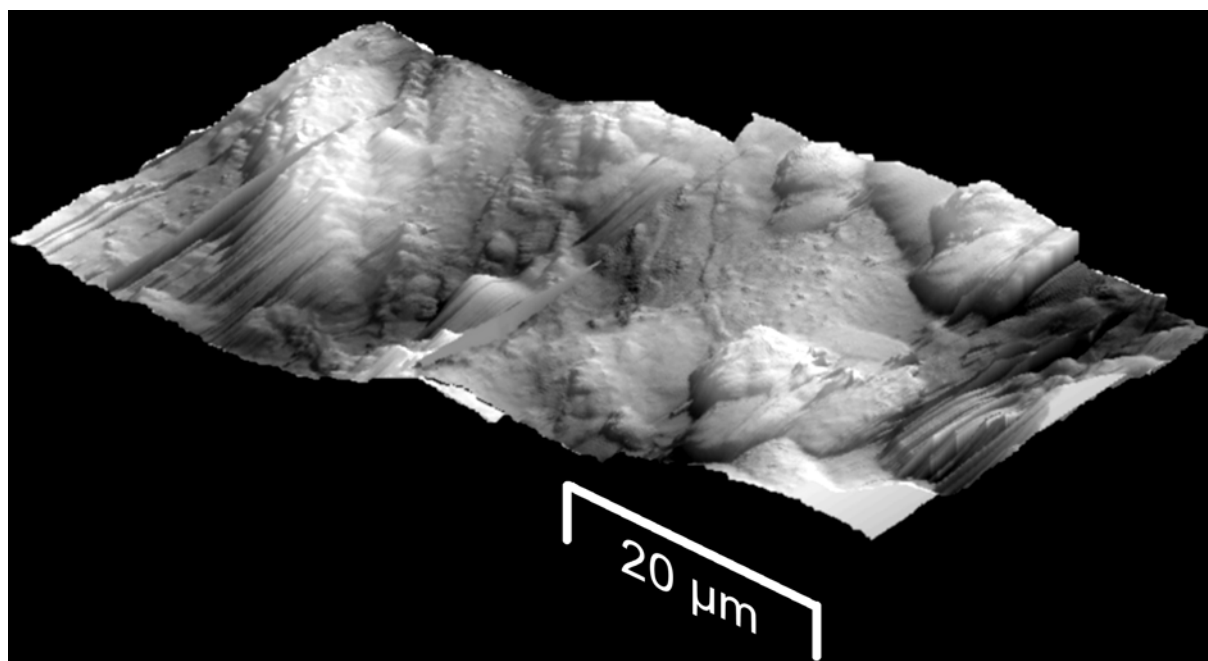


Abbildung 52  
Endothel der Aorta thoracalis des Kaninchens

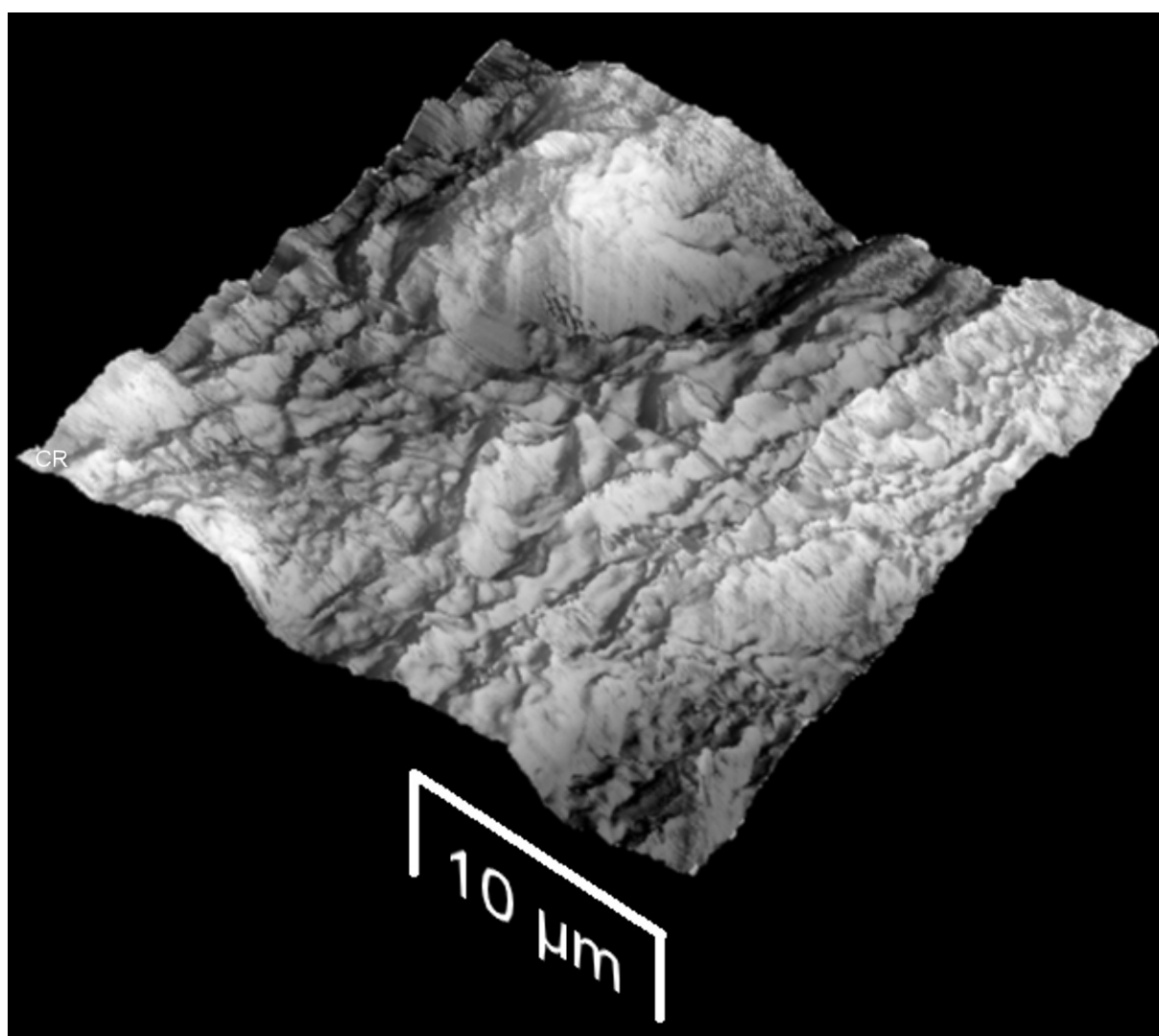


Abbildung 53  
Endotheloberfläche der Aorta thoracalis der Ratte

### 4.3 Fibrozytenähnliche Zellen (FLC)

Fibrozyten sind teils abgerundete, teils langgestreckte, abgeflachte, mit membranartigen oder stachelförmigen Fortsätzen versehene Zellen. Fibrozyten stehen auch unter Zellkulturbedingungen in einem netzartigen Zusammenhang und berühren sich mit ihren dendritischen Zytoplasmafortsätzen. Die hier rasterkraftmikroskopisch untersuchten Fibrozyten / Fibroblasten, die wir aus Rattenmyokard isolierten, zeigen alle dieser Strukturmerkmale. Als Ausdruck der

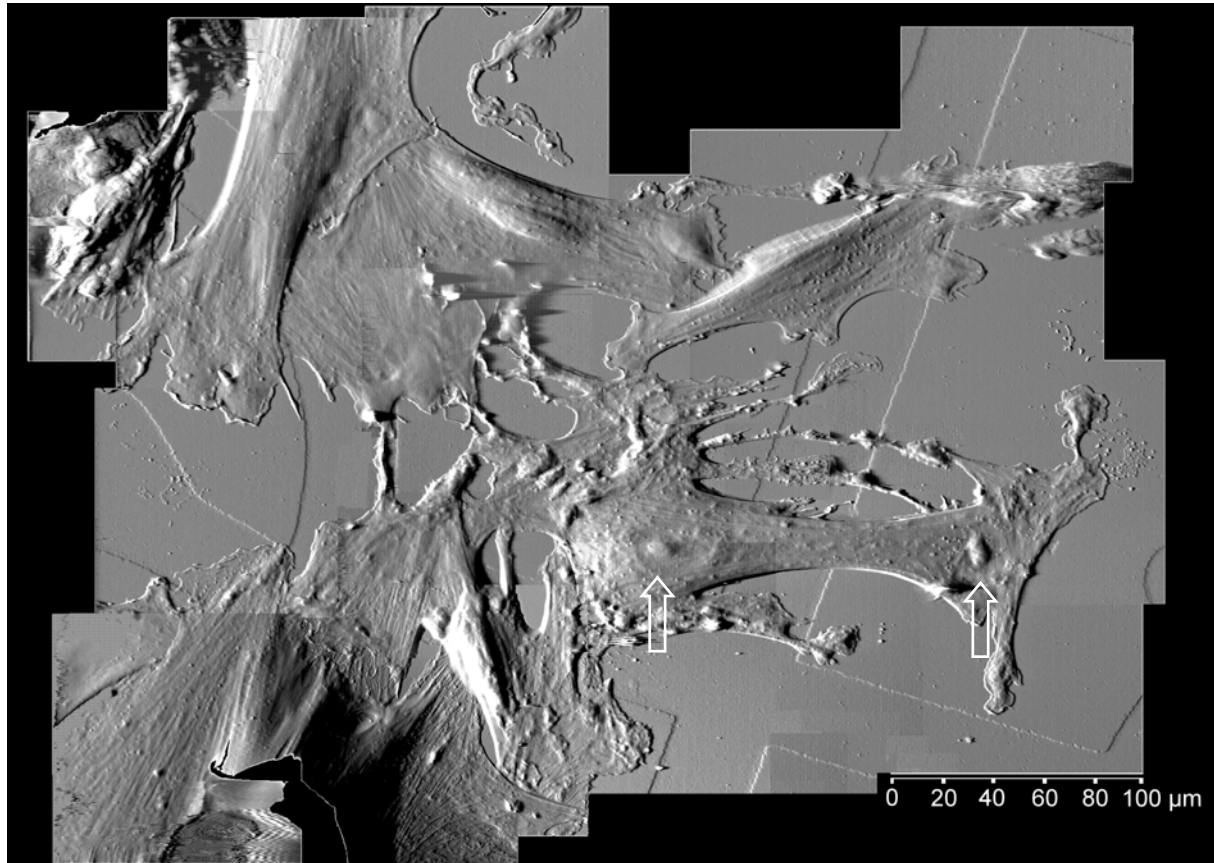


Abbildung 54  
FLC – Primärisolation aus Rattenmyokard

funktionellen Integrität der hier untersuchten Zellen befindet sich einer der Fibrozyten in mitotischer Teilung (siehe Pfeile, auf die geteilten Zellkerne gerichtet). Besonders eindrucksvoll ist das submembranös gelegene zytoskelettale Netzwerk der Fibrozyten zu erkennen. Nach unserer Erfahrung bezüglich der rasterkraftmikroskopischen Abbildung vitaler Zellen in ihrer zellphysiologischen Umgebung zeigt sich, dass insbesondere Zellen mit ausgeprägtem Zytoskelett problemlos und reproduzierbar im Tappig-Mode aber auch im Contact-Mode abbildbar sind. Im Gegensatz dazu ergeben sich bei Zellen mit schwächer ausgebildeter zytoskelettaler Matrix (z.B. Endothelzellen) größere Probleme im Rahmen der rasterkraftmikroskopischen Untersuchung. Die in Abbildung 54 gezeigten fibrozytären Zellen wurde mit folgenden AFM-Mikroskopeinstellungen untersucht:

- |   |   |                          |
|---|---|--------------------------|
| • Betriebsmodus                             | : | Contact-/ (Tapping)-Mode |
| • Cantilever                                | : | PSI-Microlever Typ C     |
| • Ermittelte Federkonstante des Cantilevers | : | 0,008 N/m                |

- Scanfrequenz : 0,5 (= 0,5 Zeilen/s)
- Auflagekraft d. Cantilever-Messtip-Systems : ~ 0,1 pN
- Messsignalverstärkung (z-Gain) : 1,5 - 2,0
- Messsignalverarbeitung : Topography-Mode
- Abbildungsareal : 100  $\mu\text{m}^2$  (pro Einzelbild)

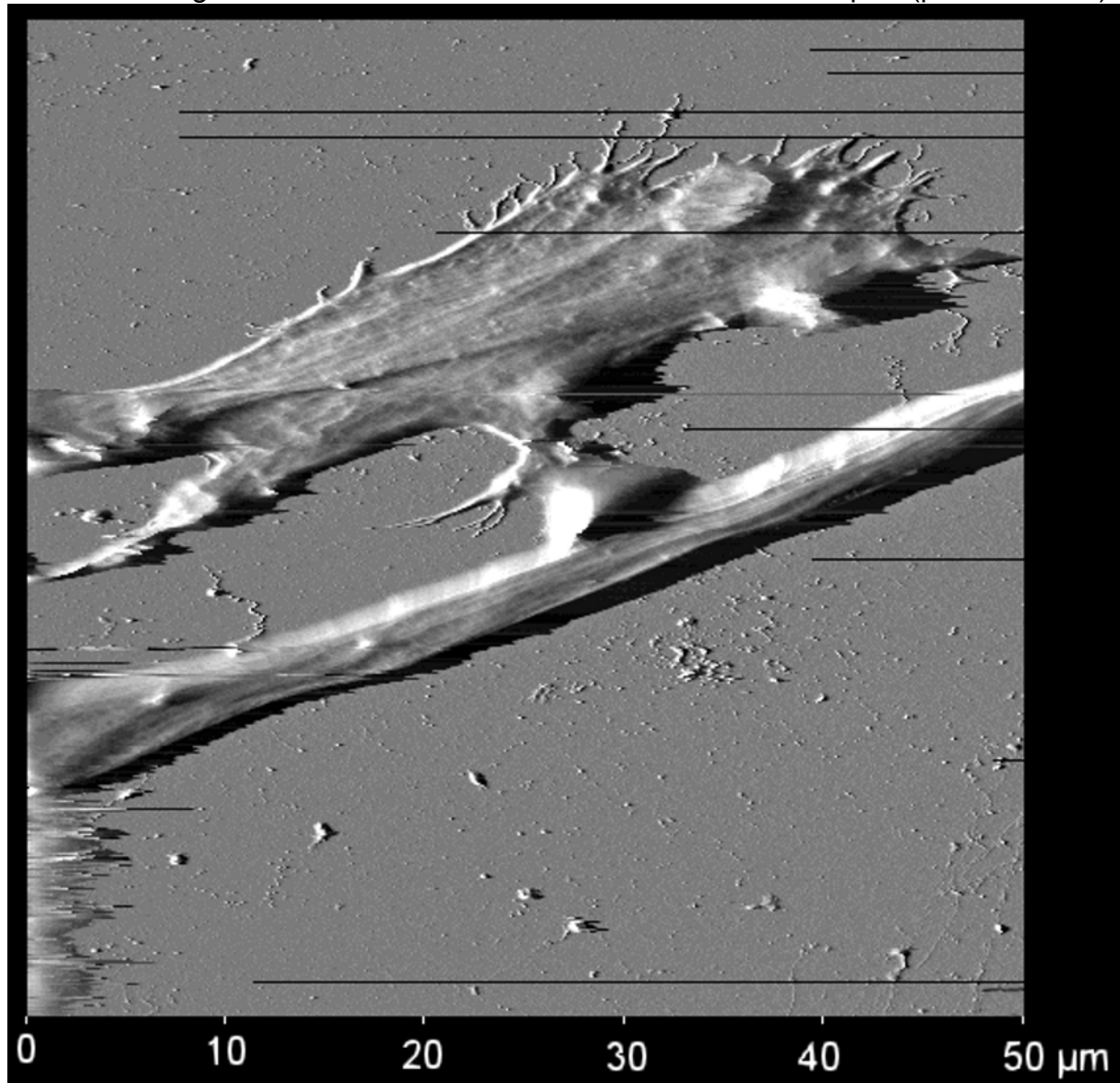


Abbildung 55  
FLC – Primärisolation aus Rattenmyokard

Mit sehr weichen (geringe Federkonstante) Cantilevern gelingt es durchaus an Fibrozyten AFM-Abbildungen im Contact-Mode zu generieren. Dennoch entschieden wir uns, um möglichst wenig Prozedur-assoziierte Abbildungsartefakte zu erzeugen, alle weiteren Versuche an diesen Zellen wiederum im bewährten Tapping-Mode durchzuführen. Der in Abbildung 55 dargestellte Fibrozyt wurde mit folgenden Scanparametern untersucht:

- Betriebsmodus : Tapping-Mode
- Cantilever : PSI-Microlever Typ F
- Ermittelte Federkonstante des Cantilevers : 0,68 N/m
- Scanfrequenz : 0,3 (= 0,3 Zeilen/s)

- Anregungsfrequenz des Cantilevers : 80 - maximal 110 kHz
- Auflagekraft d. Cantilever-Messtip-Systems : ~ 0,25 nN
- Messsignalverstärkung (z-Gain) : 2,5 - 3,0
- Messsignalverarbeitung : Error-Mode
- Abbildungsareal : 50  $\mu\text{m}^2$

An dieser Zelle demaskiert sich das feinretikuläre Zytoskelett der Fibrozyten noch ausgeprägter. Außerdem sind auf der Glasoberfläche des Objektträgers typische filamentäre, dendritische Zytoplasmaausläufer zu erkennen. Noch besser und vor allem hochauflösender gelang die Abbildung der vitalen fibrozytären Zellen bei nur geringgradig modifiziertem Setup an Zellen, die wir aus Myokard des Meerschweins isolierten und entsprechend des o.b. Procederes (siehe 3.2.3.1) kultivierten und für die AFM-Abbildung präparierten. Diese AFM-Abbildung an vitalen Fibrozyten

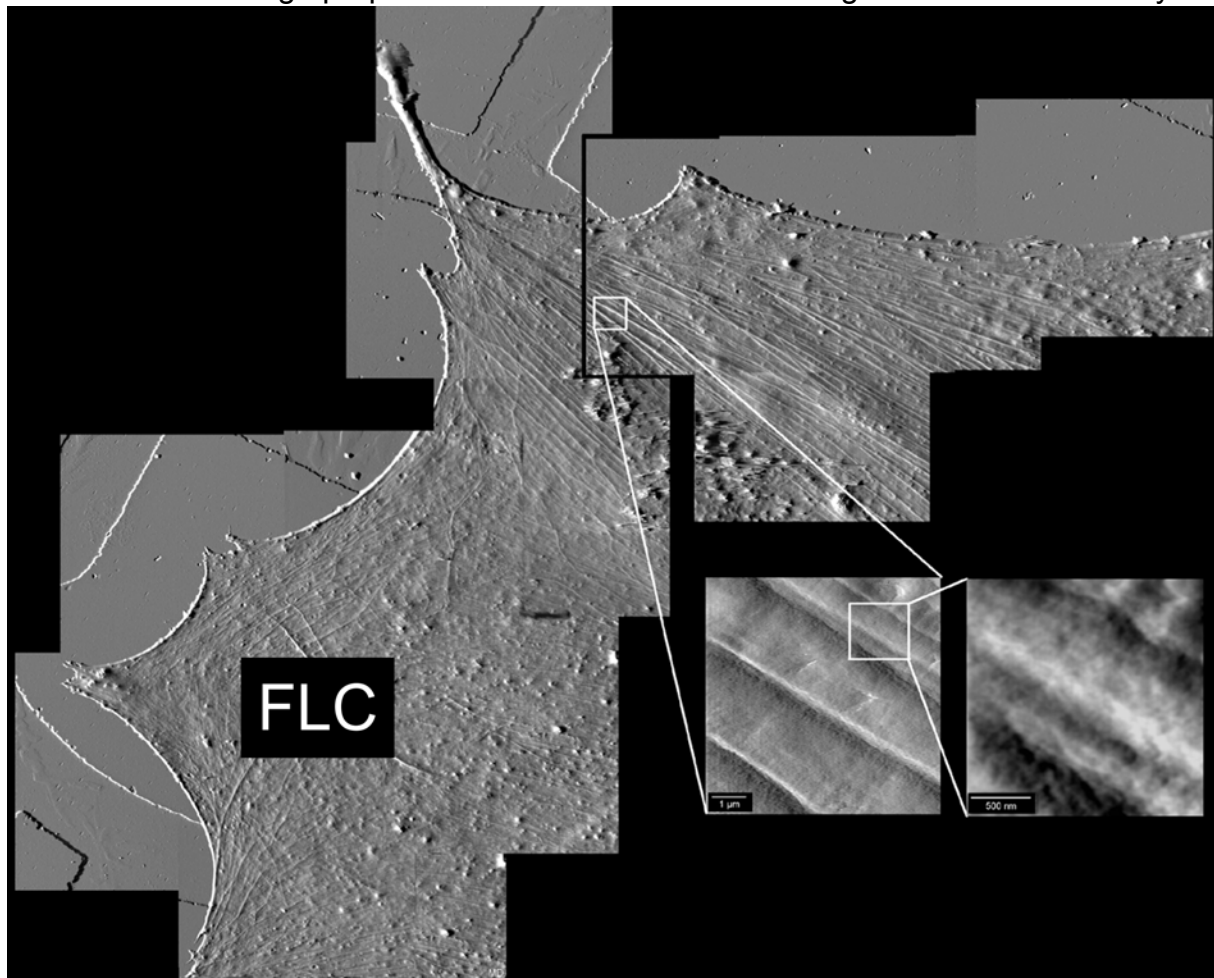


Abbildung 56

#### Fibrozyten – Primärisolation aus Myokard des Meerschweins

dokumentiert, dass bis zu einer 500 nm<sup>2</sup>- großen Scanfläche auf der Zelloberfläche exzellente Strukturauflösung mittels Rasterkraftmikroskopie erreicht werden kann. Daraus ableitend ergäbe sich prospektiv die Möglichkeit immunhistologische Versuchsansätze mit markierten (Fc-Gold-gelabelten) Antikörpern an diesen Zellen durchzuführen, um bei spezifischen Fragestellungen eine sehr genaue quantitative- und Lokalisationsdiagnostik der zu untersuchenden Oberflächenproteine (z.B. Adhäsionsmoleküle, etc.) zu erreichen. Diese Untersuchungen sind gegenwärtig für die immunhistologische Routine aufgrund des erheblichen apparativen Aufwandes

und der Schwierigkeiten der Rasterkraftmikroskopie noch nicht etabliert, werden jedoch von einigen AFM-Arbeitsgruppen bereits verfolgt.<sup>99,100</sup>

Abbildung 57 zeigt einen vitalen Fibrozyten, der aus humanem Myokard isoliert wurde und unter zellphysiologischen Bedingungen (37°C und plasmatisches Nährmedium) rasterkraftmikroskopisch untersucht wurde. Das für die Zellisolation

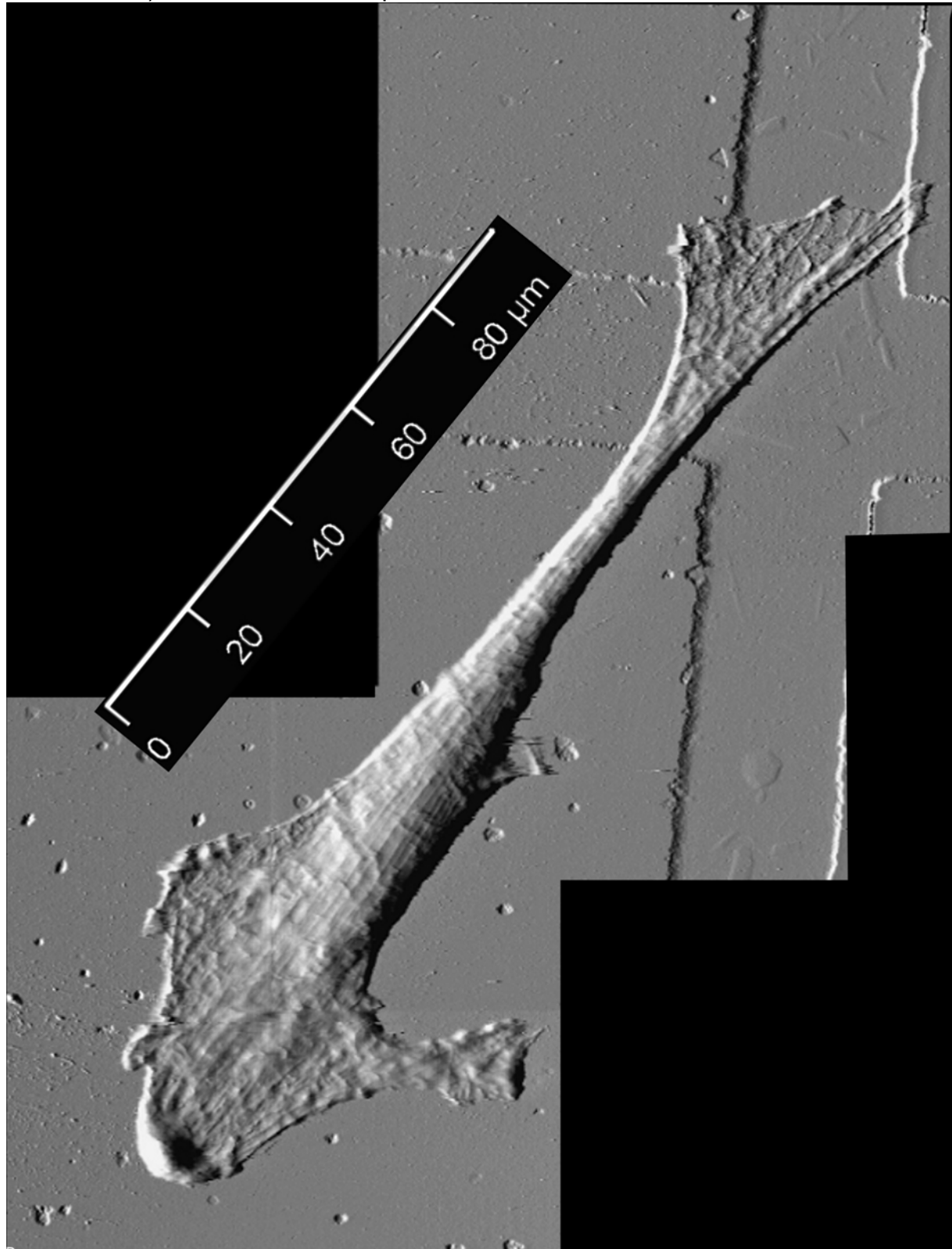


Abbildung 57  
Vitaler Fibrozyt aus humanem linksventrikulären Myokard primärisoliert

verwendete Gewebe wurde im Rahmen von ventrikelverkleinernden Operationen (Aneurysmektomie, partielle Ventrikulektomie nach Batista) in der herzchirurgischen Klinik der Charité, Campus Mitte gewonnen und uns zur Verfügung gestellt. Die Transferzeit von Entnahme des Gewebes am Patienten bis zum Beginn der Primär-Zellisolation betrug ca. 30 Minuten. Auch an dieser fast 160 µm langen Zelle erkennt man alle zytomorphologischen Stigmata fibrozytärer Zellen und insbesondere die feinretikuläre Zeichnung des Zytoskeletts. Außerdem sind im Randbereich feine granuläre Strukturen erkennbar, die globulären Proteinkomplexen entsprechen könnten. Diese Abbildung belegt außerdem, dass gegenwärtig zytomorphologische Untersuchungen mittels AFM an vitalen fibrozytenähnlichen Zellen reproduzierbar, routinemäßig möglich sind und das in der Zukunft funktionelle Untersuchungen von dynamischen Prozessen an der Zellmembranoberfläche sicherlich primär an diesen, vergleichsweise einfach handhabbaren, kardiovaskulären Zellen vorgenommen werden sollten. In Abbildung 58 sind Fibroblasten und Fibrozyten aus Myokard neonataler Ratten abgebildet. Auch bei den Blastenzellen erkennt man bereits das gut ausgebildete submembranöse Zytoskelett. Allerdings fehlen hier die

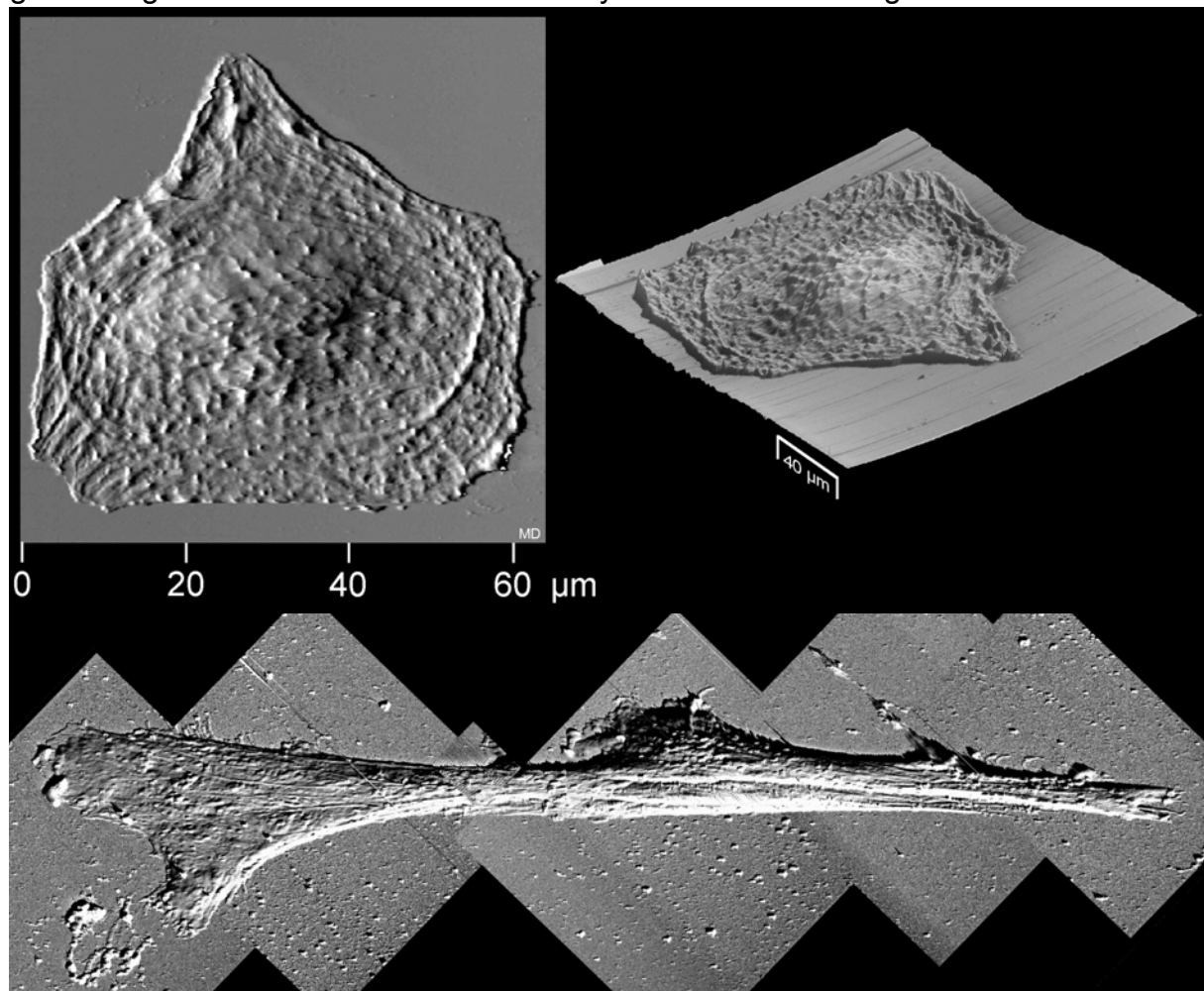


Abbildung 58

Fibroblast und Fibrozyt primärisoliert aus Myokard neonataler Ratten

dendritischen Zellausläufer vollständig. Die rasterkraftmikroskopische Abbildung dieser Zellen wurde von Herrn Dr. rer. nat. Markus Drechsler in unserem Labor vorgenommen und von ihm für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.



## 4.4 Kardiomyozyten / Kardiomyoblasten

### 4.4.1 Primärisolierte adulte, humane Kardiomyozyten

Herzmuskelfasern in vivo verzweigen sich im Gegensatz zu quergestreiften Muskelfasern und anastomosieren miteinander. Der so entstehende netzförmige Verband wird von gefäßreichem Bindegewebe ausgefüllt. Die Herzmuskelfasern zeichnen sich durch den Besitz von Glanzstreifen, den sog. Disci intercalares aus, die in regelmäßigen Abständen (in Abhängigkeit vom Kontraktionszustand des Myokards) auftreten. Aufgrund elektronenmikroskopischer Befunde ist bekannt, dass in diesen Glanzstreifen die Quergrenzen der (Zellgrenzen) der Herzmuskelfasern liegen. Die zentral gelegenen Zellkerne der Herzmuskelzellen sind kappenartig von einem fibrillenfreien, sarkoplasmareichen Hof umgeben.<sup>101</sup> Unsere

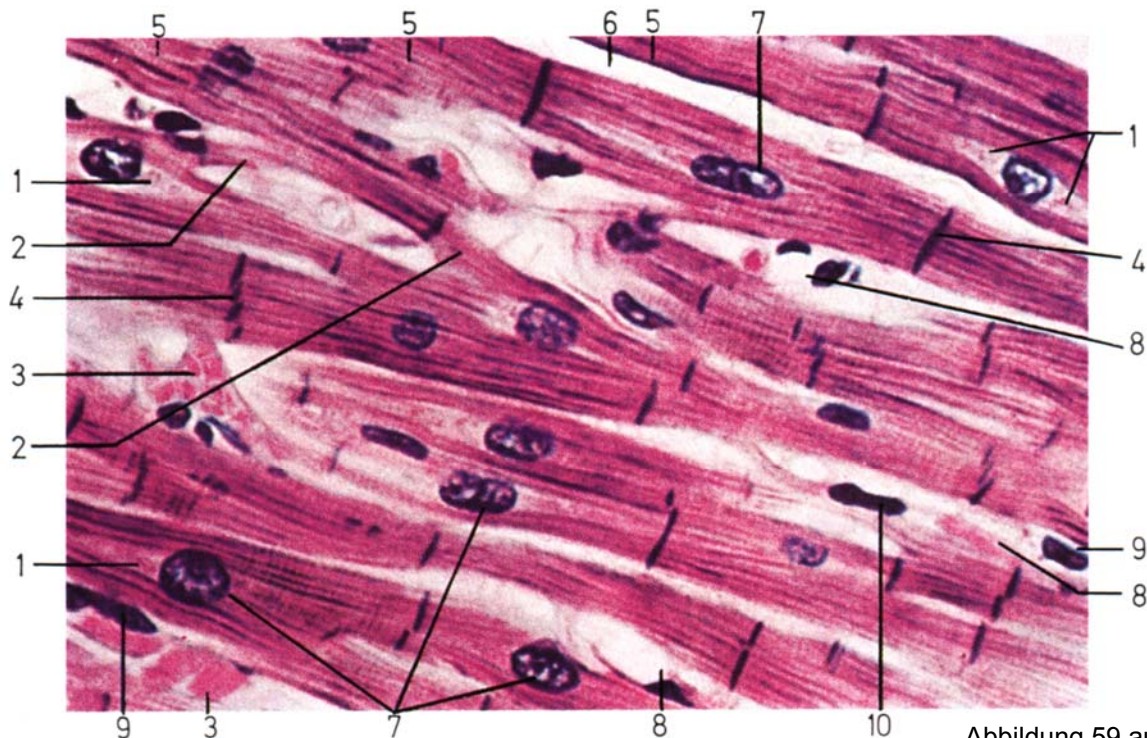


Abbildung 59 aus <sup>101</sup>

- 1 perinukleärer Hof
- 2 Verbindungen der Herzmuskelzellen
- 3 Vene
- 4 Disci intercalares
- 5 Netzbalken der Herzmuskelzellen
- 6 Interstitielles Bindegewebe
- 7 Zellkerne der Myozyten
- 8 Kapillaren
- 9 Kapillar-Endothelzellen
- 10 Fibrozyt

Zellisolationmethode löst enzymatisch die interstitiellen Bindegewebsanteile und die junctionalen Strukturen der Disci intercalares, so dass einzelne Kardiomyozyten im Lysat entstehen. Entsprechend der unter 3.2.3.1 beschriebenen Präparation wurden diese vitalen Kardiomyozyten/ Kardiomyoblasten der rasterkraftmikroskopischen Untersuchung zugeführt. Eine Muskelfaser (Kardiomyozyt) enthält einige hundert Myofibrillen, von denen jede durch sog. Z-Scheiben in ca. 2 µm lange Fächer, sog. Sarkomere unterteilt ist. Die Sarkomerlänge ist vom Kontraktionszustand der kontraktilen Proteine (Aktin und Myosin) abhängig und liegt im physiologischen

Bereich minimal bei 1,3  $\mu\text{m}$  und maximal bei 3,65  $\mu\text{m}$  (maximale Dehnung = keine Überlappung von Querbrücken mehr). Die AFM-Abbildung des ganzen, ca. 220  $\mu\text{m}$  langen Kardiomyozyten ist mit erheblichen prozedurbedingten Artefakten überlagert. Dennoch erkennt man das lichtmikroskopisch bekannte, rechteckige Bild eines Kardiomyozyten. Die durch die Einzelsarkomeren entstehende Querstreifung des

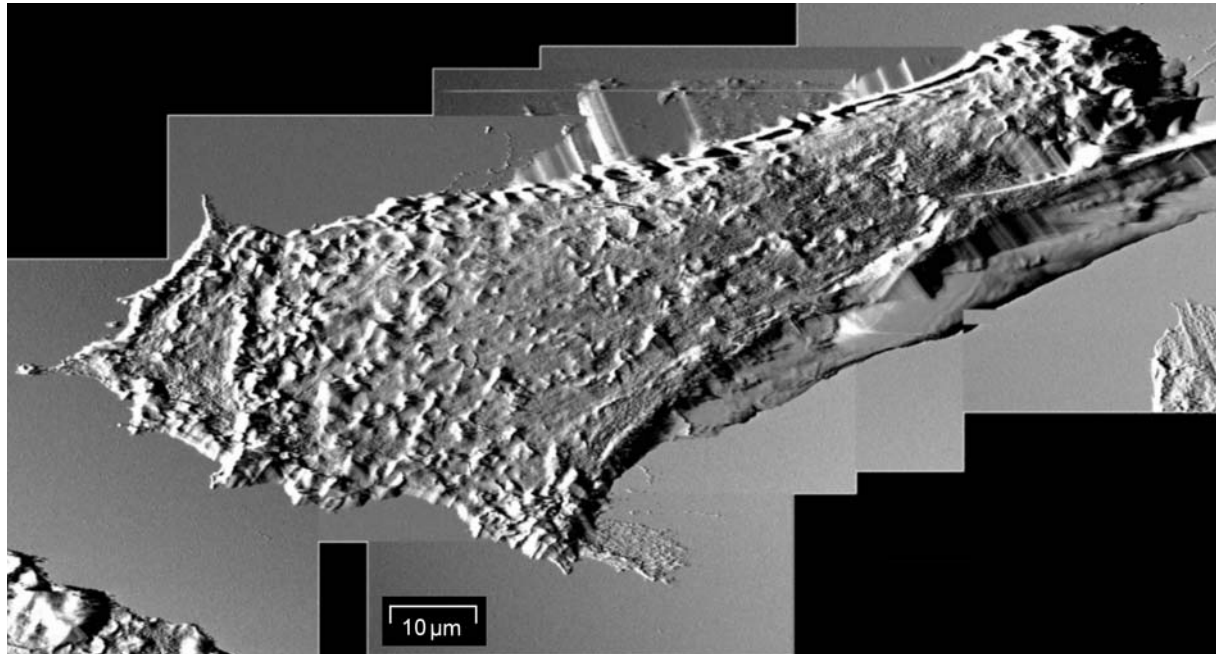


Abbildung 60

Kardiomyozyten ist in Abbildung 60 nur zu erahnen. Sehr gut hingegen sind grobgranuläre Oberflächenstrukturen zu erkennen. Diese dürften in Kenntnis des hohen Mitochondriengehaltes der Kardiomyozyten entweder sich transmembranös demaskierende Mitochondrien oder globuläre Membranproteinkomplexe sein. Bei Fokussierung in einen höheren Auflösungsbereich (Scanareal 20  $\mu\text{m}^2$ ) an einem anderen primärisolierten, vitalen, humanen Kardiomyozyten bei folgenden unveränderten Scanparametern:

• Betriebsmodus	:	Tapping-Mode
• Cantilever	:	PSI-Microlever Typ F
• Ermittelte Federkonstante des Cantilevers	:	0,71 N/m
• Scanfrequenz	:	0,3 (= 0,3 Zeilen/s)
• Anregungsfrequenz des Cantilevers	:	80 - maximal 110 kHz
• Auflagekraft d. Cantilever-Messtip-Systems	:	~ 0,25 nN
• Messsignalverstärkung (z-Gain)	:	2,5 - 3,0
• Messsignalverarbeitung	:	Error-Mode
• Abbildungsareal	:	20 $\mu\text{m}^2$

bildet sich die Sarkomerstruktur (Querstreifung) des Kardiomyozyten durch die Zellmembran hindurch deutlich ab (Abbildung 61). Es ist nach genauer Kalibrierung des Mikroskops, welche wir vor jeder Messung routinemäßig durchführten, eine Sarkomerlänge von 1,82  $\mu\text{m}$  zu ermitteln. Daraus ist ableitbar, dass der Kardiomyozyt trotz der  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Messumgebung in einem stark kontrahierten Zustand abgebildet wurde. Aus der Muskelphysiologie (Querbrückentheorie nach Huxley) ist bekannt, dass bei einer Sarkomerlänge von 2,25  $\mu\text{m}$  alle verfügbaren Querbrücken geschlagen werden können und somit eine maximale muskuläre Kraftentwicklung möglich ist. Bei 2,05  $\mu\text{m}$  Sarkomerlänge beginnen die dünnen Aktin-



Filamente sich gegenseitig sterisch zu behindern, bei einer Sarkomerlänge von  $1,82\ \mu\text{m}$  stoßen sie bereits auf falsch polarisierte Querbrücken des benachbarten Halbsarkomers.<sup>102</sup> Deutlich zeichnen sich in Abbildung 61 submembranös gelegene Zellorganellen (1) ab. Außerdem ist der zentral gelegene Zellkern (2) der Herzmuskelzellen, wie bereits lichtmikroskopisch beschrieben, kappenartig von einem fibrillenfreien Hof umgeben.

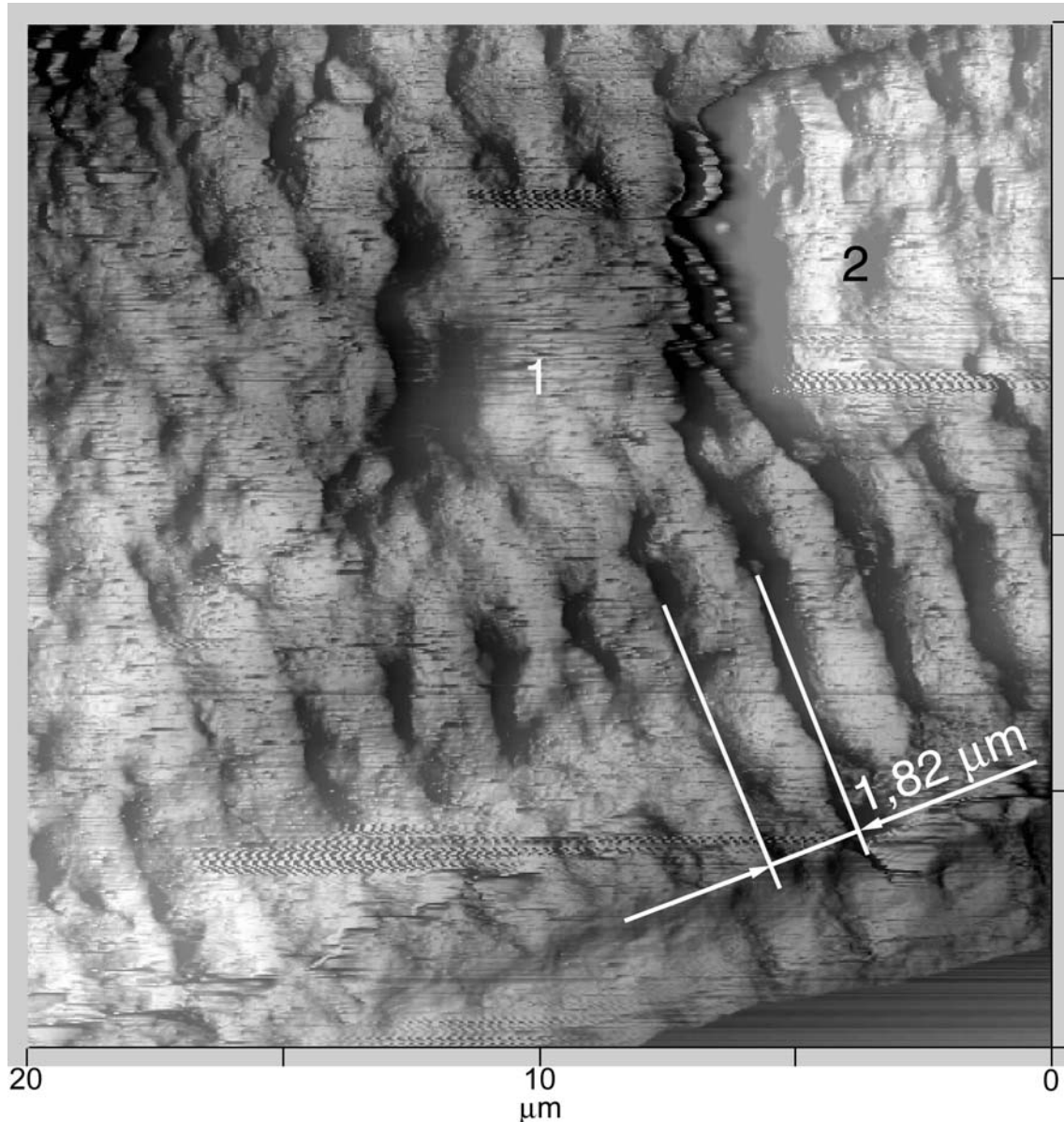


Abbildung 61

Aufgrund dieser Ergebnisse, der exakten morphometrischen Quantifizierung zellphysiologischer Zustände mittels AFM am Beispiel des Kontraktionszustandes von funktionell intakten, nicht stimulierten Kardiomyozyten, sahen wir uns veranlasst, andere, im kardiologischen Forschungslabor zur Verfügung stehende mikroskopische Referenzmethoden heranzuziehen, um einen direkten Vergleich der Auflösungsmöglichkeiten der einzelnen mikroskopischen Verfahren zu erstellen. Abbildung 62 a zeigt das ESEM-Bild der isolierten Kardiomyozyten, welches von Herrn Dr. rer. nat. M. Drechsler aus unserer Arbeitsgruppe in Kooperation mit dem Institut für Anatomie der Charité (Campus Mitte, Humboldt-Universität zu Berlin) erstellt wurde. Die „environmental scanning electron microscopy“ (ESEM) vermag im

Gegensatz zu allen anderen elektronenmikroskopischen Techniken hydrierte Proben hochauflösend abzubilden. Dennoch handelt es sich in Abbildung 62 a nicht um vitale Kardiomyozyten sondern ausschließlich um, nach elektronenmikroskopischer Standardpräparation rehydrierte, avitale Kardiomyozyten. Die konfokale Laserscanmikroskopie (Abbildung 62 c) erbringt im Vergleich der lichtmikroskopischen Techniken, wie unter 1.2 beschrieben, das höchste Auflösungsvermögen und lässt unter Verwendung von verschiedenen Techniken (z.B. Phasenkontrast) ein 3-dimensionales Bild entstehen. Im Vergleich zu diesen genannten, herkömmlichen Techniken vermag die Rasterkraftmikroskopie (Abbildung 62 b) vitale Kardiomyozyten

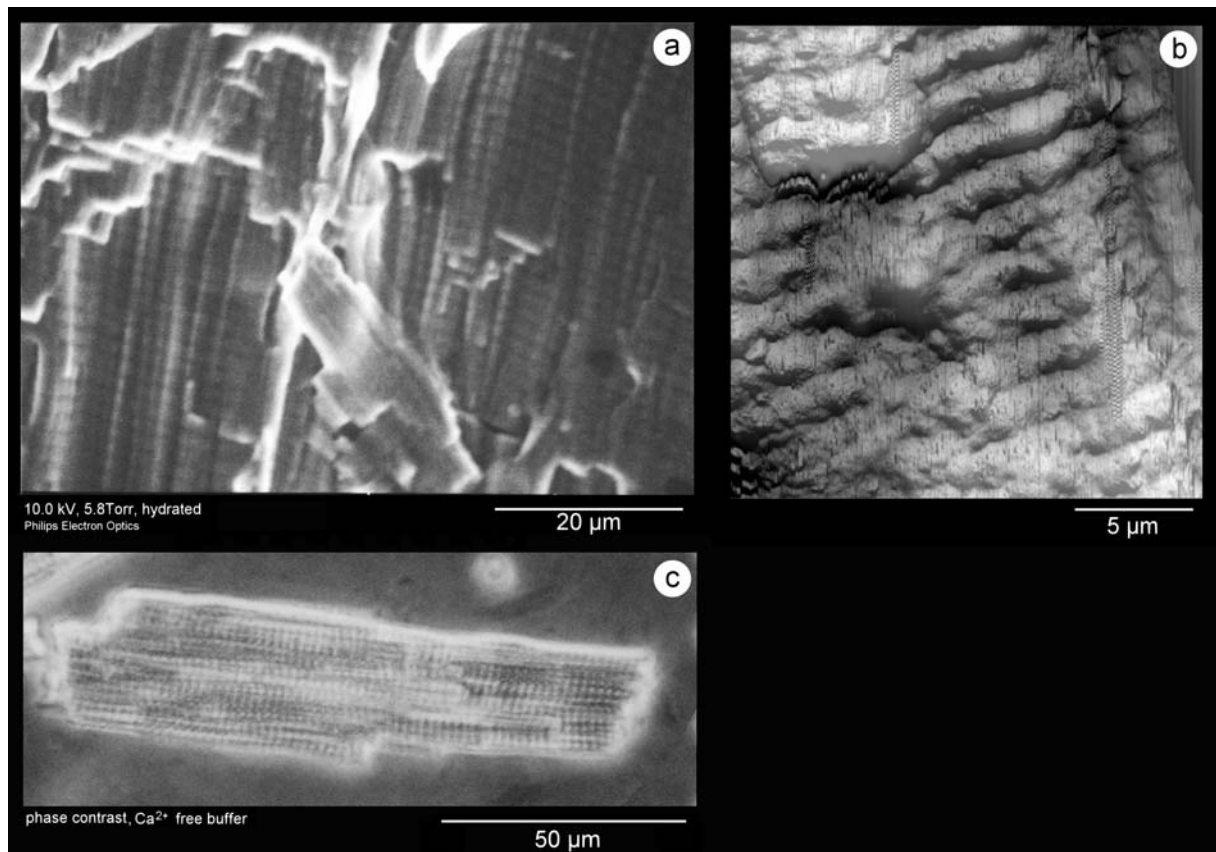


Abbildung 62

myozyten in zellphysiologischer Umgebung mit überlegenem Auflösungsvermögen, real 3-dimensional abzubilden und zu vermessen. Dennoch bleibt festzuhalten, dass insbesondere für die routinemäßige Untersuchung dynamischer, zellphysiologischer Prozesse (Substrattransport, Ca<sup>2+</sup>-Regulation an Kardiomyozyten u.v.m.) die etablierte konfokale Laserscanmikroskopie nicht entbehrlich ist und gegenwärtig für diese Fragestellung den Goldstandard darstellt. Funktionelle rasterkraftmikroskopische Untersuchungen an vitalen Zellen sind insbesondere deshalb schwierig, da bei dieser Methode ein umgekehrt proportionales Verhältnis zwischen räumlichem und zeitlichem Auflösungsvermögen besteht. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten vitalen Zellen wurden mit dem Ziel untersucht, möglichst hohe räumliche Auflösung zu erreichen. Hierbei dauerte ein Scanvorgang bei 512x512 Bildpunkten am oben gezeigten Kardiomyozyten ca. 25 Minuten. Das in diesem zeitlichen Auflösungsbereich Millisekunden dauernde zelluläre Regulationsmechanismen nicht detektierbar waren, ist naheliegend. Details zum reziproken

Zusammenhang zwischen zeitlichem und räumlichem Auflösungsvermögen werden in Kapitel 3.1.4.2 ausführlicher behandelt.

#### 4.4.2 Zellkulturkardiomyozyten der H9C2-Zelllinie

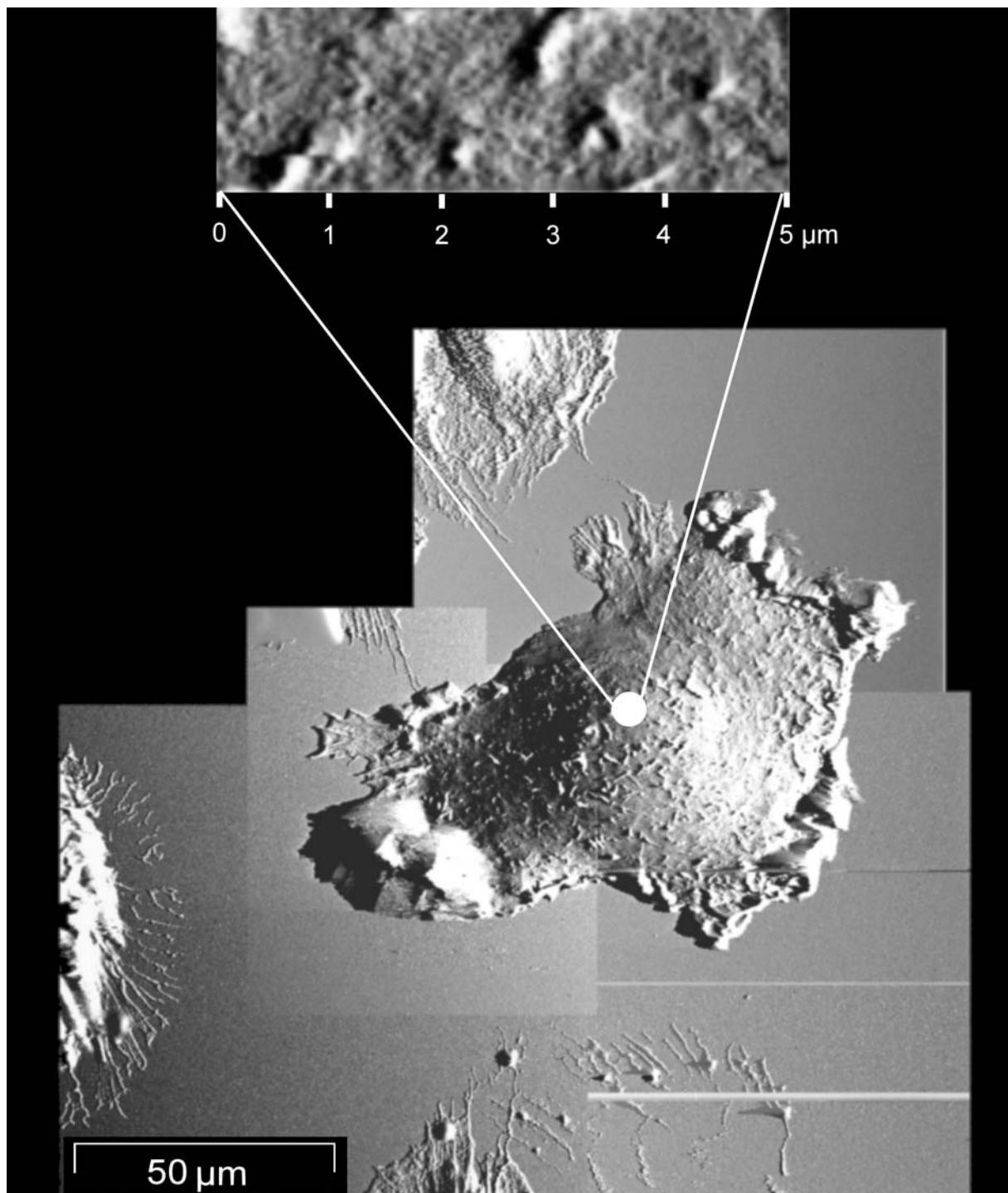


Abbildung 63

Diese zumeist blastenartig imponierenden immortalen Zellkultur-Kardiomyozyten wurden rasterkraftmikroskopisch mit folgenden Geräteeinstellungen abgebildet:

- Betriebsmodus : Tapping-Mode
- Cantilever : PSI-Microlever Typ F
- Ermittelte Federkonstante des Cantilevers : 0,71 N/m

- Scanfrequenz : 0,3 (= 0,3 Zeilen/s)
- Anregungsfrequenz des Cantilevers : 80 - maximal 110 kHz
- Auflagekraft d. Cantilever-Messtip-Systems : ~ 0,25 nN
- Messsignalverstärkung (z-Gain) : 3,0 - 3,5
- Messsignalverarbeitung : Topography-Mode
- Abbildungsareal : 100  $\mu\text{m}^2$  - 5  $\mu\text{m}^2$

Auch bei höherer Auflösung ist im Gegensatz zu den humanen ventrikulären Kardiomyozyten keine Querstreifung nachweisbar. Interessanterweise ist in Abbildung 63 der Nachweis einer möglichen Migrationsbewegung der Zellen auf dem Objektträger detektierbar. Es finden sich im perizellulären Bereich netzartige, filiforme Strukturen (Zellreste, Proteine?) die von den zytoplasmatischen Zellausläufern der Kardiomyozyten sicher abgrenzbar sind und definitiv nicht mit der Zelle in Verbindung stehen. Bei Fokussierung auf den zentralen Bereich des Kardiomyozyten findet sich, ein bereits bei anderen Zelltypen beschriebenes, feingranuläre Muster mit einigen interponierten, größeren globulären Strukturen (Zellorganellen, die sich transmembranär abzeichnen oder globuläre Membranproteinkomplexe). Bei dieser Zelllinie war auffällig, dass geringste Osmolaritätsänderungen des zellphysiologischen Mediums innerhalb der AFM-Flüssigkeitszelle (z.B. durch Verdunstung des freien Wassers bei unzureichendem Mediumsaustausch während des Scanvorganges) dazu führten, dass die Messspitze von der Zelloberfläche abriss und eine erneute Annäherung nicht mehr gelang. Es bleibt anzunehmen, dass sich durch diese hyperosmolare Dehydratation, die elastischen Eigenschaften der Zelle veränderten (Exsikkose) bzw. die Zelle sogar abstarb.

#### 4.4.3 Primärisolierte Kardiomyozyten neonataler Ratten

Primärisolierte Kardiomyozyten neonataler Ratten wachsen unter Zellkulturbedingungen nicht als solitäre Zellen, sondern bilden nach kurzer Zeit ein zelluläres und funktionelles Synzytium. Auch ohne externe Stimulation sind diese Zellen kontraktile aktiv (Kontraktionsfrequenz des Synzytiums ~ 70/min). Im  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Medium erschöpft sich diese Spontankontraktion allmählich (Depletion der

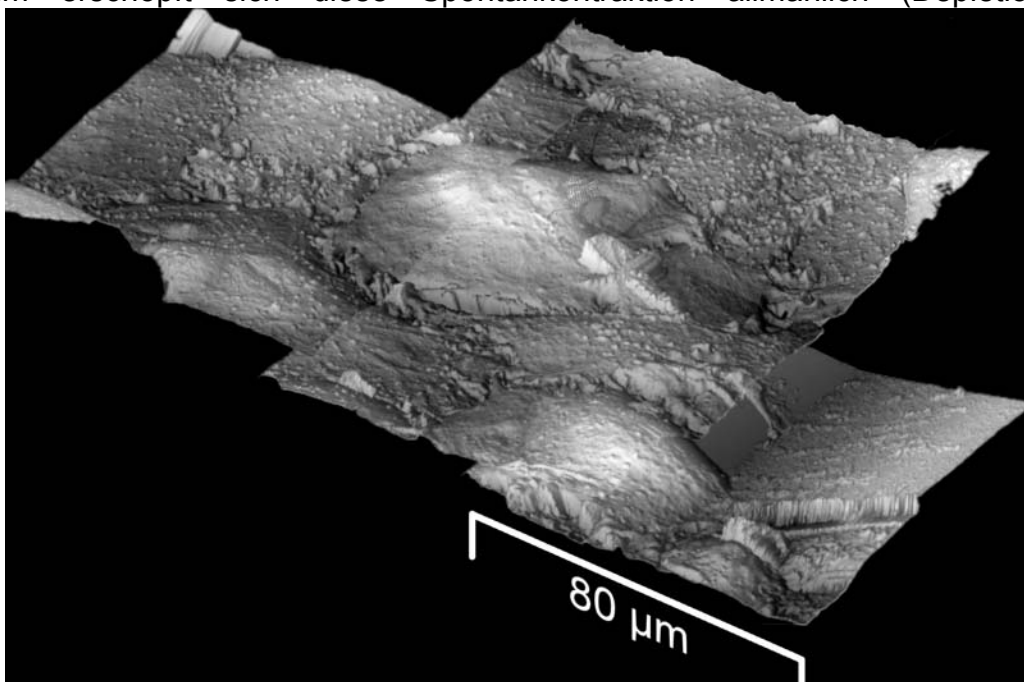


Abbildung 64

sarkoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher), so dass die Zellen im nicht kontrahierenden Zustand der AFM-Untersuchung zugeführt werden konnten. Im Unterschied zu den o.b. Kardiomyozyten gelang die Abbildung dieser Zellen im Contact-Mode, ohne die Zellen nennenswert in ihrer physiologischen Integrität zu alterieren. Dennoch erkennt man in Abbildung 65 sehr eindrucksvoll, wie im Contact-Mode kleinste

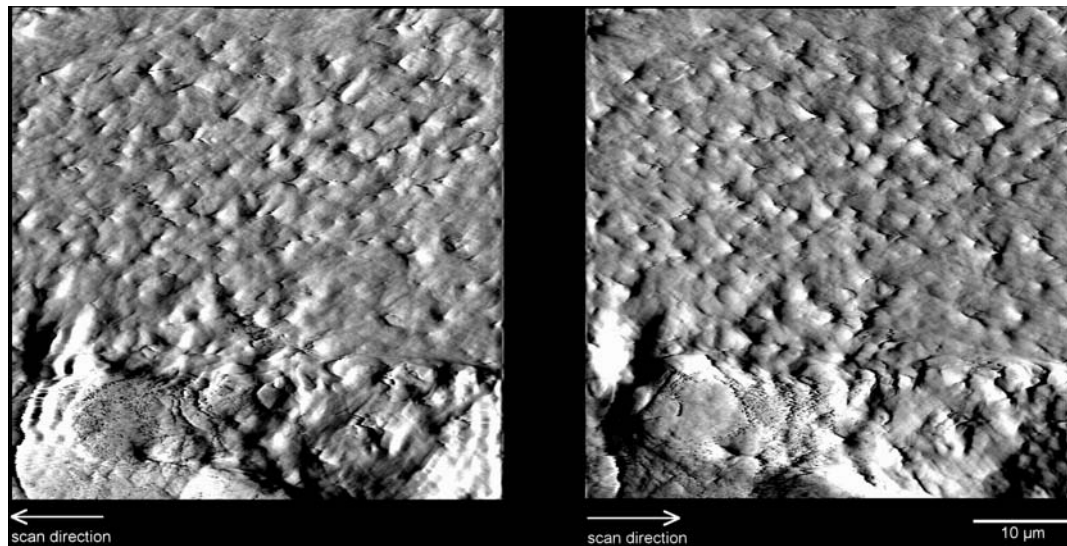


Abbildung 65

Membranproteine und Filopodien in Abhängigkeit von der horizontalen Scanrichtung beeinflusst werden.

Die hier abgebildeten neonatalen Kardiomyozyten sind ca. 60-70 µm lang und im Gegensatz zu den zylinderförmigen, rechteckig imponierenden adulten Kardio-

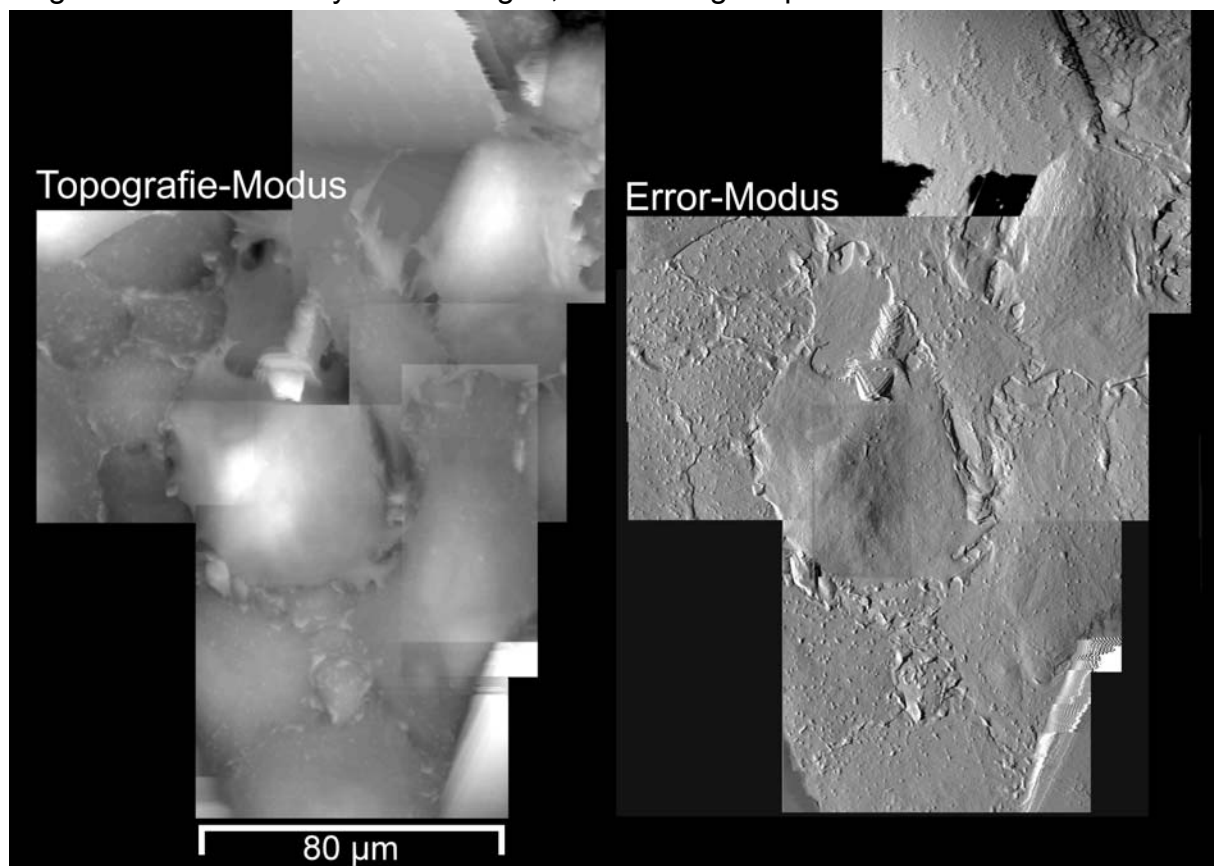


Abbildung 66



myozyten eher oval und abgerundet. Sehr deutlich sind die interzellulären Junctionen des funktionellen Synzytiums zu erkennen. Wir fanden de facto bei keiner unserer Untersuchungen an neonatalen Kardiomyozyten vereinzelte (solitäre) Zellen, sondern prinzipiell myozytäre Zelllayer. Abbildung 66 verdeutlicht nochmals den Unterschied zwischen den beiden Modi der Messsignalverarbeitung - dem kontrastreichen Error-Mode (exakte horizontale Topografie, ohne auswertbare vertikale Messwerte) und dem Topography-Mode, der eine detaillierte 3-dimensionale Vermessung der Zellen ermöglicht.

## 4.5 Thrombozyten

Thrombozyten sind zellkernfreie Zellen, die aus Megakaryozyten im Knochenmark entstehen. Aufgrund des fehlenden Zellkernes sind Thrombozyten nicht oder nur eingeschränkt zur Neusynthese von Proteinen in der Lage. Blutplättchen gehören zu den kleinsten korpuskulären Bestandteilen des Blutes und sind nach lichtmikroskopischen Analysen zwischen 2 und 6  $\mu\text{m}$  groß. Die mittlere Überlebenszeit thrombozytärer Zellen liegt bei ca. 7 Tagen, so dass eine tägliche Neusynthese von ungefähr 20 % der zirkulierenden „anukleären Zellen“ im Knochenmark nötig ist. In Abhängigkeit vom Aktivierungszustand kommt es bei Thrombozyten zu einer typischen Formveränderung („shape change“). Im nichtaktivierten Zustand (Abbildung 67) zeigen die Plättchen eine diskoide Form mit

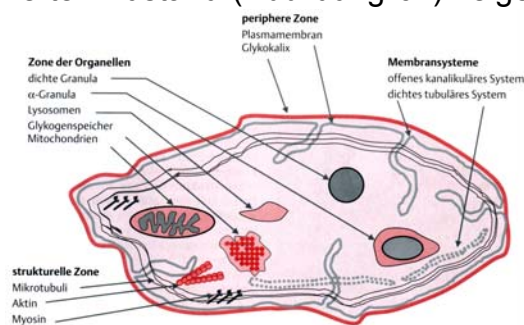


Abbildung 67 aus <sup>103</sup>

einer Oberfläche von  $\sim 8\mu\text{m}^2$ . Adhäsion an Fremdoberflächen (z.B. Kollagen nach Gewebsverletzungen) und lösliche Agonisten der Thrombozytenaggregation wie ADP und Thrombin induzieren die intrazelluläre Reorganisation des Zytoskeletts mit resultierenden Ausstülpungen der Plasmamembran (Pseudopodien), die Degranulation zytoplasmatischer Vesikel und die Exvagination von prothrombotischen Membranvesikeln (Abbildung 68). Die entstehenden, sog. Echinosphärozyten vergrößern dabei ihre Oberfläche auf  $\sim 13\mu\text{m}^2$ .<sup>103</sup>

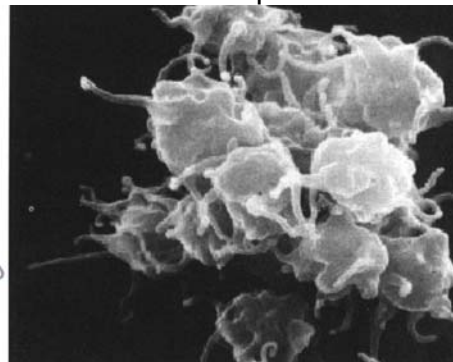
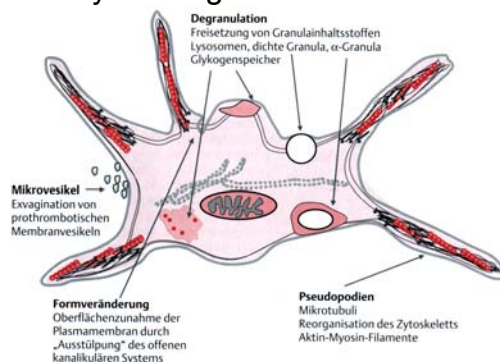


Abbildung 68 aus <sup>103</sup>

Die, wie unter 3.2.4 beschrieben, präparierten Thrombozyten wurden nach aufwendiger Optimierung der Scanparameter rasterkraftmikroskopisch mit folgenden Einstellungen untersucht:

- Betriebsmodus : Tapping-Mode
- Cantilever : PSI-Microlever Typ F
- Ermittelte Federkonstante des Cantilevers : 0,71 N/m
- Scanfrequenz : 0,3 (= 0,3 Zeilen/s)
- Anregungsfrequenz des Cantilevers : 85 - maximal 100 kHz
- Auflagekraft d. Cantilever-Messtip-Systems : ~ 0,18 nN
- Messsignalverstärkung (z-Gain) : 3,0 - 3,5
- Messsignalverarbeitung : Topography-Mode/  
Error-Mode
- Abbildungsareal : 16 - 8  $\mu\text{m}^2$

In Abbildung 69 ist ein humaner Thrombozyt abgebildet, der kontinuierlich über 90 Minuten rasterkraftmikroskopisch untersucht wurde. In Übereinstimmung mit den licht- und elektronenmikroskopisch beschriebenen Daten findet sich eine abgerun-

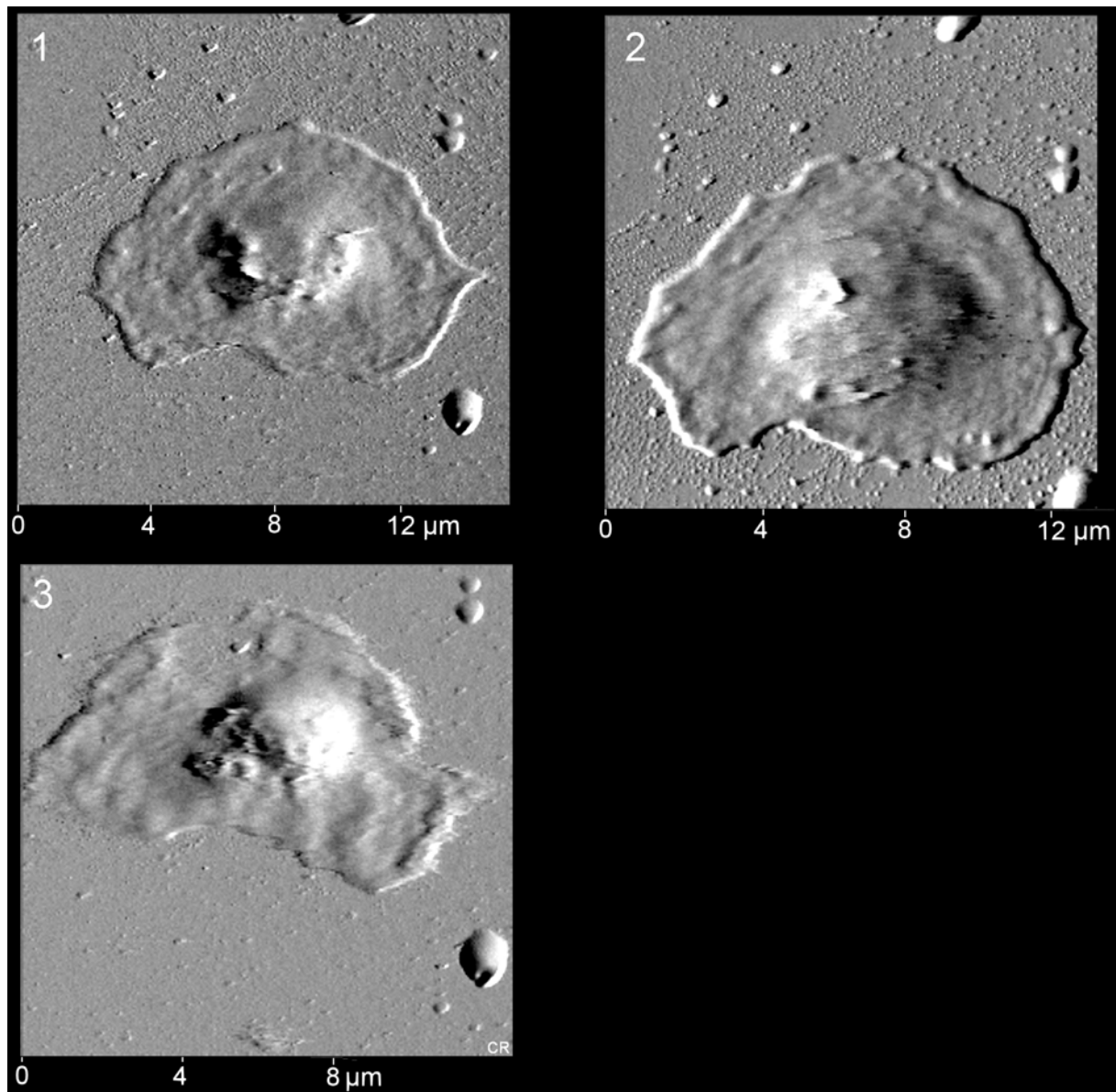


Abbildung 69

dete, diskoide Zellform. Hinsichtlich der Größenverhältnisse imponieren die hier untersuchten Zellen etwas größer ( $\sim 8 \mu\text{m}$ ) als vorbeschrieben. Im Vergleich zur ersten Abbildung (1) ist eine deutliche Veränderung der Zellform in Abbildung 69 (2) zu erkennen. Die bei 3 Uhr detektierbare Filopodie in (1) ist nach 30-minütigem kontinuierlichen, rasterkraftmikroskopischen Untersuchungsverlauf in (2) deutlich retrahiert. Der Randbereich des Thrombozyten erscheint nach 30 Minuten etwas wulstiger aufgeworfen und die Gesamtzelloberfläche ist sichtbar größer geworden. Außerdem fällt perizellulär eine deutliche Zunahme feingranulärer Strukturen auf. Postuliert man, dass diese nachweisbaren perizellulären Strukturen durch Degranulation intrazellulärer Vesikel bzw. durch Exvagination von prothrombotischen Membranmikrovesikeln entstehen und dass die Größenzunahme der Gesamtzelle nicht artefaktbedingt ist, so kann man diese morpho-analytischen Zeichen als Kriterien der mechanisch induzierten, thrombozytären Aktivierung rasterkraftmikroskopisch exzellent nachweisen. Da während der Akquirierung aller drei Scans in Abbildung 69 keine Änderung der zellphysiologischen Messbedingungen vorgenommen wurde und keinerlei lösliche Aktivatoren (ADP) der thrombozytären Funktion appliziert wurden, ist davon auszugehen, dass die sichtbaren Stigmata der thrombozytären Aktivierung allein durch die abbildungsbedingte Interaktion zwischen Messsonde (Cantilever-Tip-System) und untersuchtem Thrombozyten entstehen. In (3) ist nochmals eine erheblich Formveränderung nachweisbar. Allerdings gelang nach diesem Scanvorgang keine erneute Annäherung an die Zelle, so dass die erkennbare Zellretraktion in (3) nach ca. 90-minütigem Scanvorgang mutmaßlich Ausdruck eines prämortalen Zellzustandes ist. Diese Ergebnisse waren mit den o.g. Scanparametern reproduzierbar an Thrombozyten aus humanen Thrombozytenkonzentraten, die an Glasoberflächen (Glasobjektträger) adhärirten zu erzielen. Die, auf den abgebildeten Thrombozyten zentral gelegenen Strukturen entsprechen am wahrscheinlichsten zytoplasmatischen Organellen (Mitochondrien, Glykogenspeicher, alpha-Granula, Lysosomen etc.), die sich transmembranös im rasterkraftmikroskopisch generierten Bild demaskieren.

Nach Zugabe von  $2 \mu\text{M}$  ADP zum Untersuchungspuffer (PBS) sind massive Formveränderungen des Thrombozyten nachweisbar (Abbildung 70). Nunmehr sind die o.b. Pseudopodien des aktivierten Thrombozyten plastisch erkennbar. Auch die Membranoberfläche erscheint im Sinne der Plasmamembranausstülpungen des

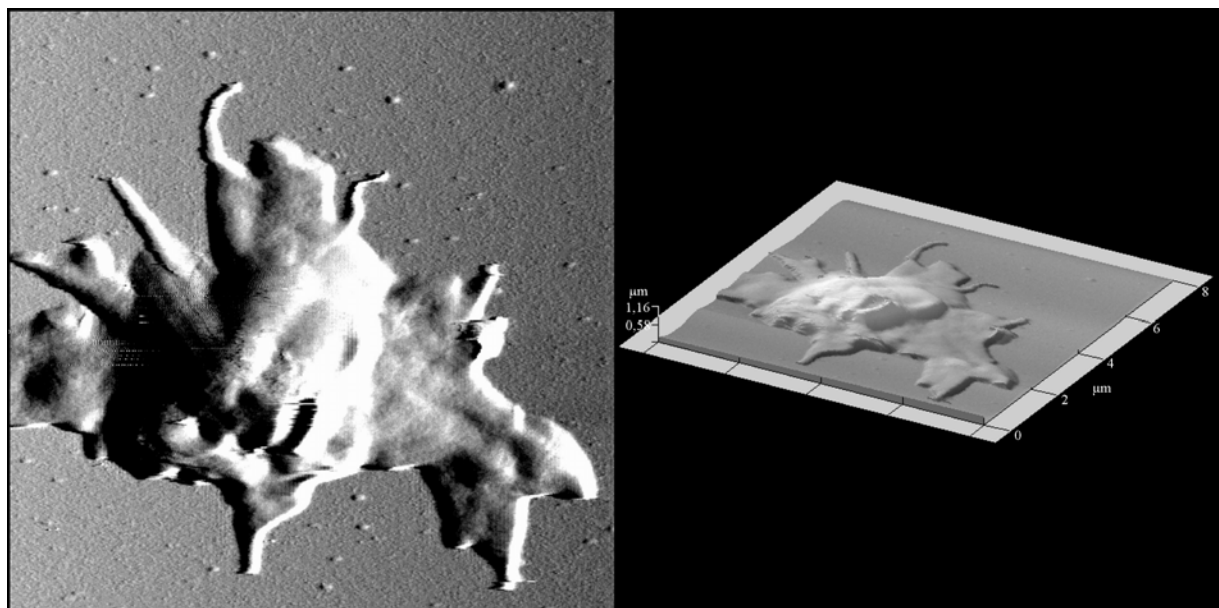


Abbildung 70



offenen kanalikulären Systems (siehe Abbildung 68) deutlicher strukturiert und aufgeworfen. Im Gegensatz zum kontakt- und abbildungsbedingt aktivierten Thrombozyten der Abbildung 69 ist die, durch ADP induzierte Aktivitäts- und Formveränderung durch den Scanprozess kaum noch beeinflussbar, so dass anzunehmen ist, dass der Thrombozyt bei maximaler pharmakologischer Aktivierung durch ADP, gegenüber der rasterkraftmikroskopisch bedingten, mechanischen Alteration resistenter wird (Abbildung 71 links: Zeitpunkt 0, rechts: nach 30-minütigem, kontinuierlichen Scanprozess). Elektronenmikroskopische Referenzbilder aktivierter Thrombozyten zeigt Abbildung 72. Die Abbildung dieser, hier untersuchten und an Glasoberflächen adhärennten Thrombozyten auf koronarinterventionellen Materialien (Stents) wird im Kontext in Kapitel 4.7 ausführlich beschrieben.

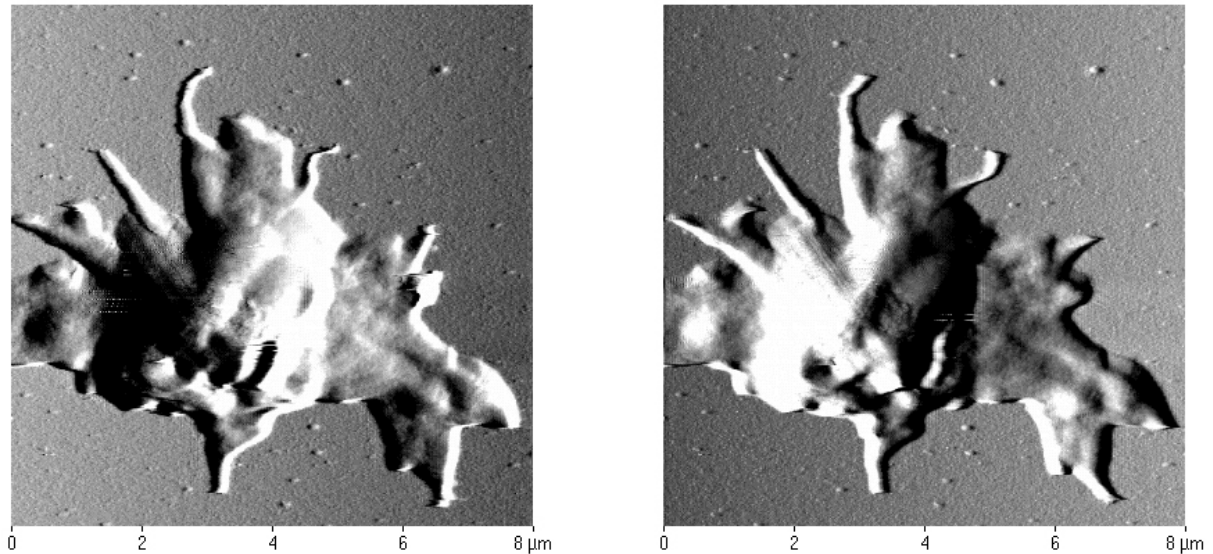


Abbildung 71

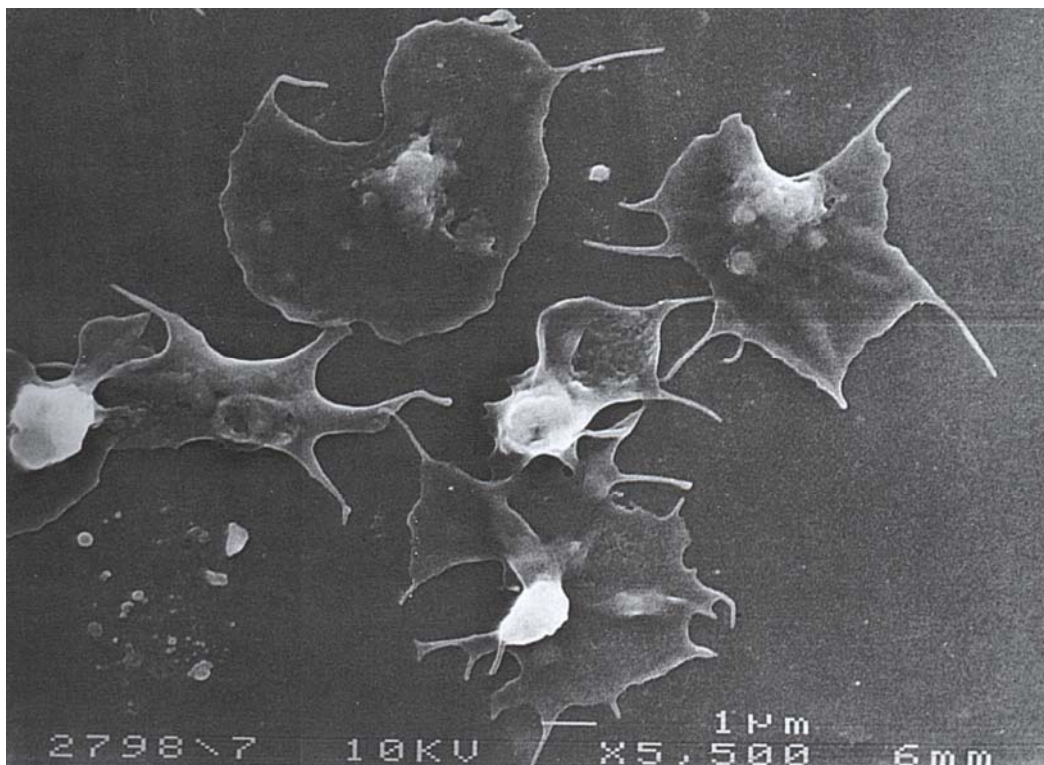


Abbildung 72 aus <sup>103</sup>

## 4.6 Abbildung komplexer, oligomerer Proteine – Das 20S-Proteasom

Vor 20 Jahren wurde von Hershko et al. in einer Reihe hervorragender Experimente, ein hitzestabiles Polypeptid entdeckt, welches für die energieabhängige intrazelluläre proteolytische Spaltung in Retikulozyten eine entscheidende Rolle spielt.<sup>104</sup> Dieses Polypeptid, Ubiquitin genannt, kommt in allen eukaryotischen Zellen vor, besteht aus 76 Aminosäuren und ist hoch konserviert. Seit dieser Zeit belegen eine Reihe von Studien die Bedeutung dieses nicht-lysosomalen, proteolytischen Systems für die Aufspaltung intrazellulärer Proteine. Viele Reviews diskutieren die molekulare Regulation, die Genetik, die biologische Bedeutung, die Biochemie und Enzymologie und die Bedeutung des Ubiquitin-Proteasom-Systems unter pathophysiologischen Bedingungen.<sup>105,106,107,108,109</sup> Ein vereinfachtes Schema des ubiquitinabhängigen proteolytischen Abbauweges ist in Abbildung 73 skizziert. Intrazelluläre Proteine, die

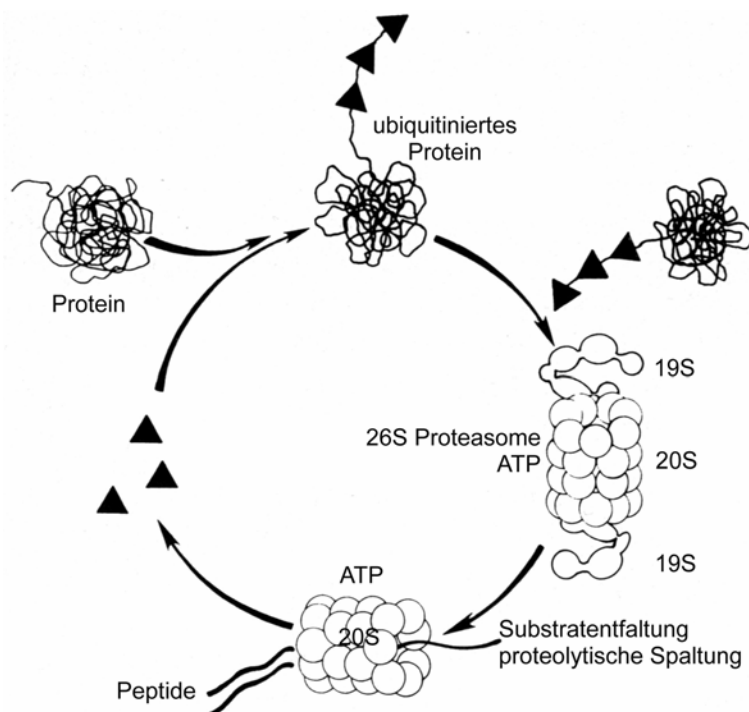


Abbildung 73

auf diesem Weg abgebaut werden, müssen zunächst an Polyubiquitin gebunden werden, um vom proteolytisch aktiven 26S Proteasom erkannt zu werden („Tagging-Hypothese“). Der erste Schritt in diesem System ist die ATP-abhängige Aktivierung der karboxy-terminalen Glycinreste des Ubiquitins durch das Ubiquitin-Aktivierungs-Enzym. Im nächsten Schritt wird das aktivierte Ubiquitin an ein Ubiquitin-Carrier-Protein, das Ubiquitin-konjugierende-Enzym (E1) gebunden. Die Konjugation des Polyubiquitins und des abzubauenen intrazellulären Proteins erfolgt entweder direkt via E1 oder über den Weg, dass die

Zielproteine zunächst an eine spezifische Ubiquitin-Protein-Ligase gebunden werden bevor das Ubiquitin durch E1 übertragen wird. Die so gebundenen Proteine werden dann vom 26S Proteasom ATP-abhängig degradiert und es entstehen Peptide und freies Ubiquitin. Das 26S Proteasom wird aus einem Molekül des 20S Proteasoms und zwei 19S Proteasommolekülen ATP-abhängig synthetisiert, wobei das 20S Proteasom das katalytische Zentrum des 26S Komplexes darstellt. Nach der proteolytischen Spaltung wird Ubiquitin aus dem Polyubiquitinmolekül freigesetzt und steht für den proteolytischen Ubiquitin-Proteasom-Pathway wieder zur Verfügung.<sup>110</sup> Insbesondere die Deubiquitinierung der Proteine (z.B. Abspaltung des Ubiquitins vom Substrat) durch Ubiquitin-C-terminale-Hydrolase oder durch Ubiquitin-Konjugat degradierendes Enzym spielt eine große Rolle bei der Regulation des intrazellulären Proteinabbaus.<sup>111</sup> Natürlich sind auch die anderen erwähnten Enzyme und deren Regulation in diesem Zusammenhang entscheidend. Interessanterweise konnte

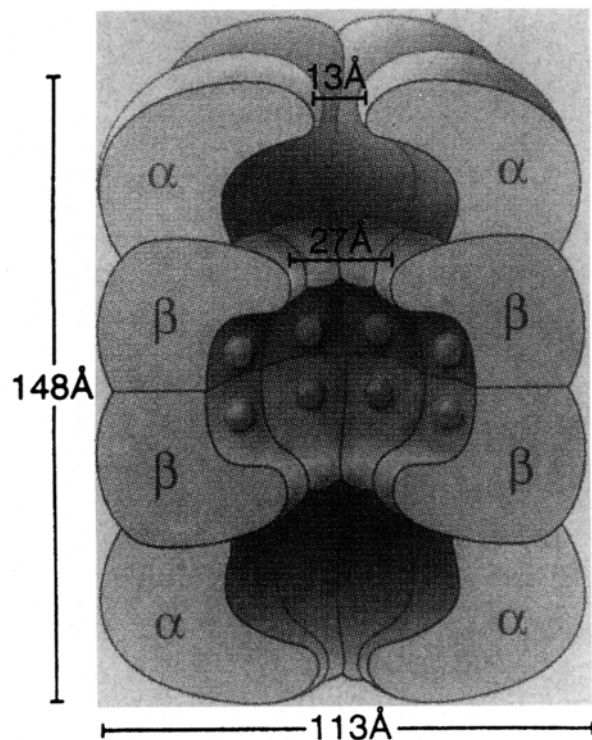


Abbildung 74

gezeigt werden, dass verschiedene Proteine, die bei der Tumorgenese eine Rolle spielen, deubiquitinierende Enzyme sind.<sup>112</sup>

Das 20S Proteasom humaner Erythrozyten wurde elektronenmikroskopisch strukturanalytisch untersucht und es zeigte sich ein komplexes oligomeres Protein, das 17 nm x 11 nm groß ist.<sup>113</sup> Es besteht aus vier unterteilten Ringen, die einen zentralen Kanal mit 3 Kammern umschließen.<sup>114</sup> Die zentrale Kammer bildet mit ihren  $\beta$ - Untereinheiten das katalytische Zentrum des 20S Proteasoms. Jeder dieser 4 Ringe wird aus jeweils 7  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ - Untereinheiten gebildet. Schematisch ist dieser Aufbau in Abbildung 74 verdeutlicht. Für die rasterkraftmikroskopische Abbildung der präparierten 20S-Proteasomen wurden folgende Mikroskopiereinstellungen vorgenommen:

- |  |   |                                |
|--|---|--------------------------------|
| • Betriebsmodus                              | : | Tapping-Mode                   |
| • Cantilever                                 | : | PSI-Microlever Typ E           |
| • Ermittelte Federkonstante des Cantilevers  | : | 0,02 N/m                       |
| • Scanfrequenz                               | : | 0,3 (= 0,3 Zeilen/s)           |
| • Anregungsfrequenz des Cantilevers          | : | 49 KHz                         |
| • Auflagekraft d. Cantilever-Messtip-Systems | : | ~ 0,4 pN                       |
| • Messsignalverstärkung (z-Gain)             | : | 3,0                            |
| • Messsignalverarbeitung                     | : | Error-Mode/<br>Topography-Mode |
| • Abbildungsareal                            | : | 200 nm <sup>2</sup>            |

Die Versuche wurden bei Raumtemperatur und in physiologisch konzentriertem PBS-Medium vorgenommen. Die bei allen anderen Versuchen benutzte Temperier-

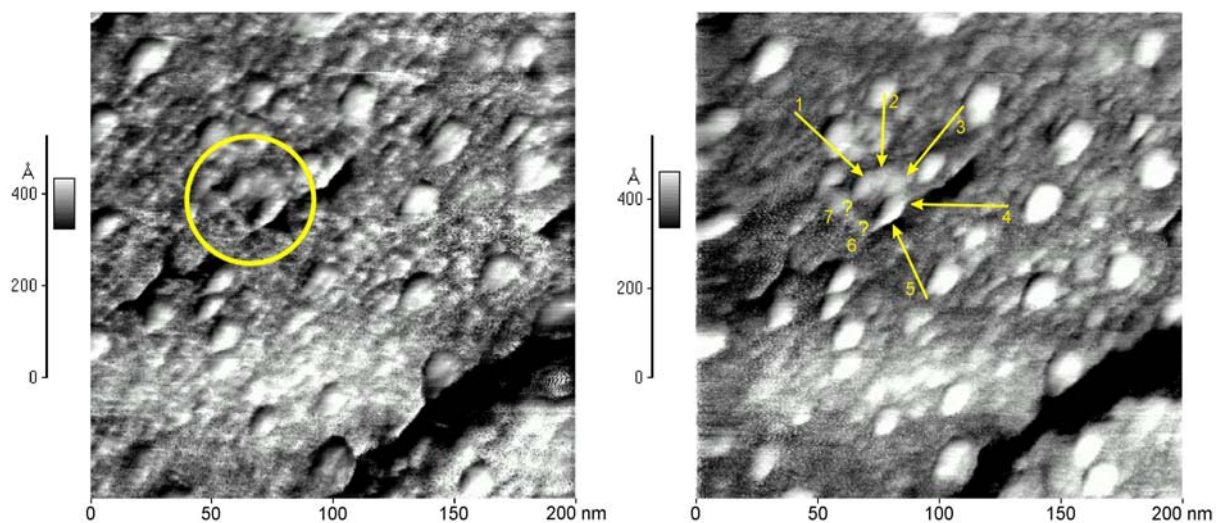


Abbildung 75



Einrichtung wurde nicht angewendet, um bei rasterkraftmikroskopischer Abbildung im atomaren Auflösungsbereich (Größenordnung der 20S-Proteasom  $\sim 120 \text{ \AA}$ ) alle möglichen messtechnischen Störeinflüsse zu minimieren und somit das Signal-Rausch-Verhältnis zu optimieren.

Man erkennt in Abbildung 75 und 76 mehrere, ca. 8- 20 nm große globuläre Strukturen. Es lässt sich eine Struktur identifizieren, die aus 5-7 globulären Domänen ringförmig zusammengesetzt ist und einen zentralen Kanal (Porus) bildet. In der 3-dimensionalen Ansicht (Abbildung 73) des Topografie-Bildes (in Abbildung 72 rechts) ist diese Struktur noch besser nachweisbar. Eine offensichtliche Strukturhomologie zum o.b. 20S-Proteasom ist nicht zu verkennen. Das im gesamten Bildausschnitt nur eine dieser typischen, komplexen, oligomeren Proteinstrukturen identifizierbar ist, liegt unter Umständen daran, dass nur dieses eine 20S-Proteasom orthogonal zur Scanebene auf dem Objektträger liegt und die typische 7-oligomer-Ringstruktur nur

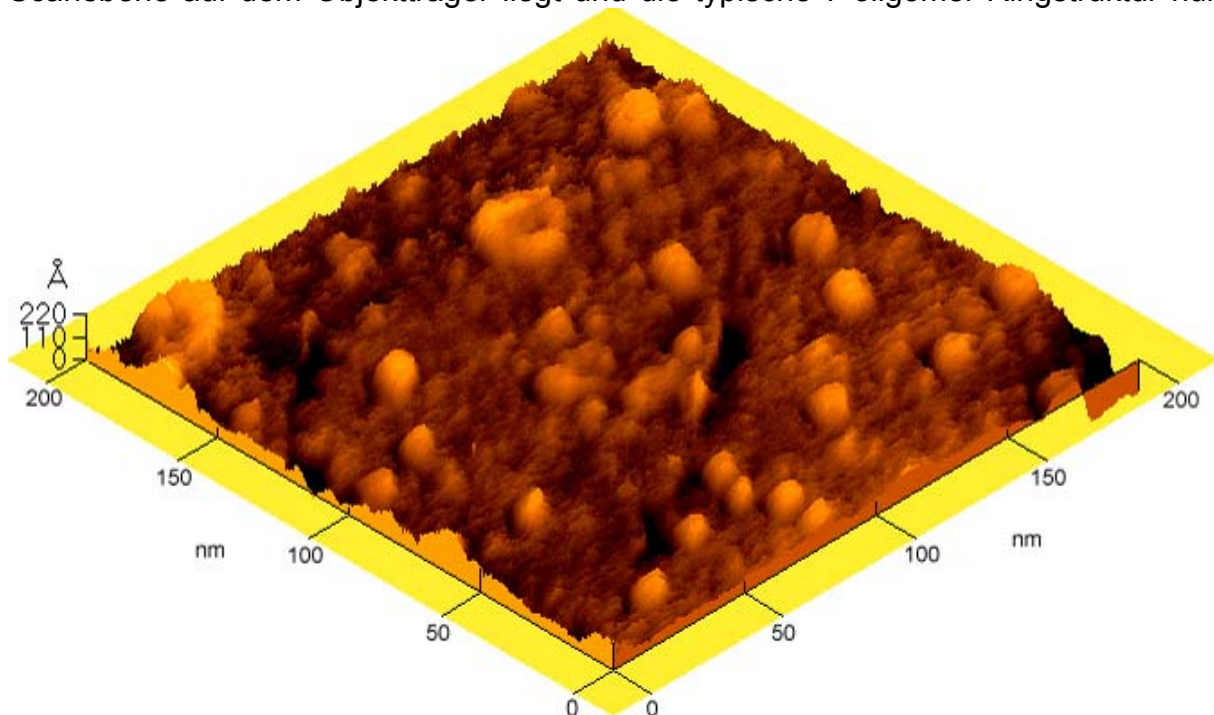


Abbildung 76

so abbildbar wird. Der Vorteil der Rasterkraftmikroskopie kommt in diesem Hochauflösungsbereich insofern zum Tragen, dass man neben der formellen Strukturhomologie auch die 3-dimensionalen Größenverhältnisse der abgebildeten Struktur vermessen kann. In Abbildung 77 wurde der Außendurchmesser der detektierten Ringstruktur gemessen. Es findet sich eine Ringdurchmesser von 253-256 Å. Im Vergleich zu den elektronenmikroskopischen Daten und Daten Röntgenstrukturanalyse des 20S-Proteasoms (Außendurchmesser 113 Å) ist die hier detektierte Ringstruktur hinsichtlich des Außendurchmessers 2,265 mal größer. Der Innendurchmesser des Ringes ist 69 Å, so dass die kanalbildenden Proteindomänen ca. 184 Å einnehmen. Der Porendurchmesser des Kanals ist mit 13 – 27 Å beschrieben. Demzufolge ist der rasterkraftmikroskopisch gemessene Kanaldurchmesser der detektierten Ringstruktur deutlich größer (2,55- 5,3- fach größer). Postuliert man, dass die abgebildete Struktur einem 20S-Proteasom entspricht so wäre zu diskutieren, welche Ursachen bei erstaunlicher Strukturhomologie für die Erklärungs der Größendifferenz (funktioneller Zustand, Präparationsabhängigkeit, AFM-Untersuchung hydrierter Proteasomen ??) in Frage kommen.

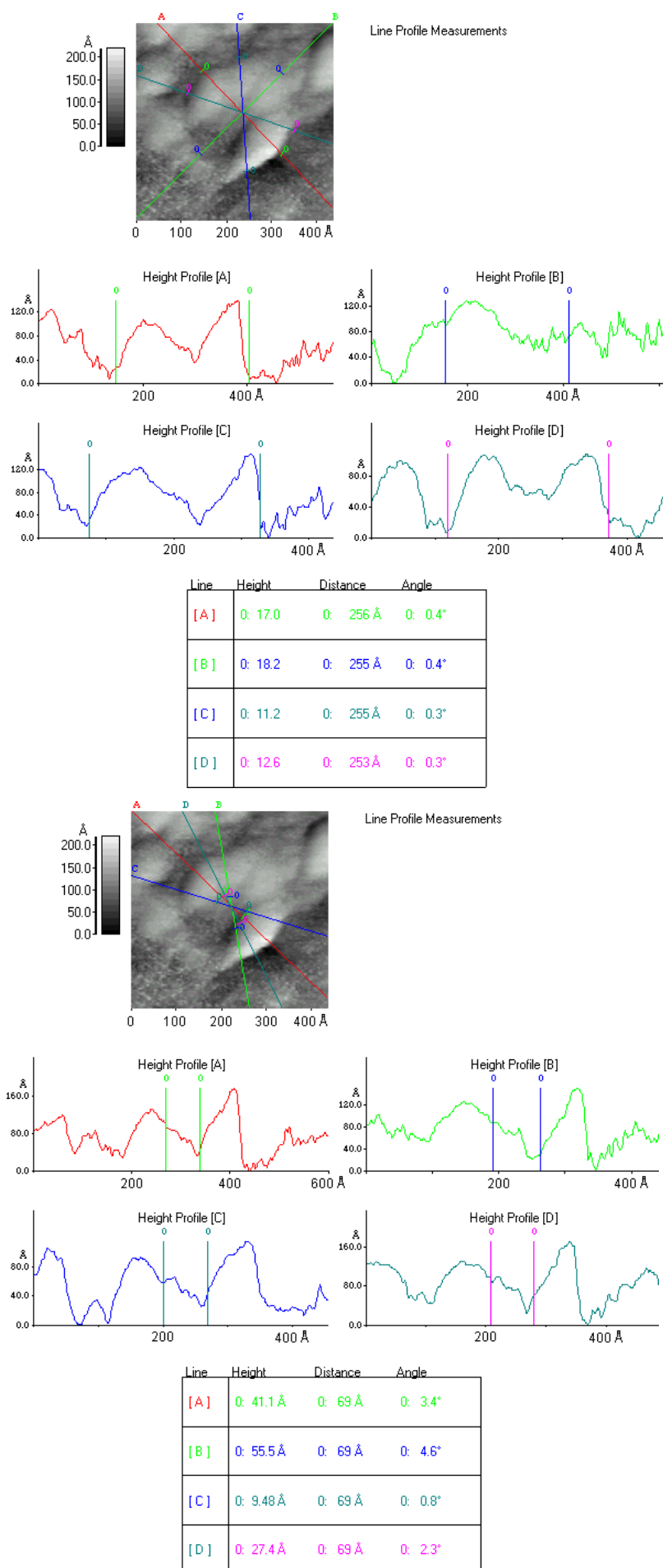


Abbildung 77

## 4.7 Koronarinterventionelle Stents

Die kathetergestützte, interventionelle Therapie der stenosierenden koronaren Herzkrankheit gehört heutzutage zu den Domänen der modernen klinischen Kardiologie. Neben der herkömmlichen perkutanen transluminalen Koronarangioplastie (PTCA) und verschiedener anderer intrakoronarer Interventionstechniken (Rotablation, Laserrekanalisation und DCA) ist die Implantation koronarer Stents mittlerweile zum Standardverfahren für die Behandlung der stenosierenden Koronargefäßveränderungen geworden. Grosse multizentrische Studien (FRISC II, TACTICS) belegen, dass mittels Stentimplantation in Kombination mit periinterventioneller Thrombozytenaggregations- hemmender Begleitmedikation (z.B. GPIIb/IIIa-Antagonisten) die besten postinterventionellen Ergebnisse hinsichtlich der Offenheitsraten des Zielgefäßes, und der definierten Endpunkte Tod, Re-Infarkt und Wiederauftreten instabiler Angina pectoris erzielt werden. Dieses frühinterventionelle Vorgehen bei instabiler Angina pectoris und Myokardinfarkt in Kombination mit o.g. Begleitmedikation ermöglicht die rasche und stabile Rekanalisation eines stenosierten bzw. okkludierten Koronargefäßes und verhindert somit die Ischämie-assoziierten myokardialen Komplikationen (Infarkt, plötzlicher Herztod, Herzinsuffizienz). Durch den Einsatz der antithrombozytären Begleitmedikation konnte eine Begleitkomplikation der interventionellen Therapie, die akute Stentthrombose, welche typischerweise innerhalb der ersten 48-72h nach Stentimplantation auftritt, beeinflusst werden. Dennoch ergibt sich bei ca. 15 % der behandelten Patienten das Langzeitproblem (nach 4-6 Wochen) der In-Stent-Restenosierung, welche weniger durch thrombotische Okklusion des Stents, sondern vordergründig und primär durch eine überschüssende neointimale Proliferation im Bereich des implantierten Stents hervorgerufen wird. Gegenwärtig existieren viele Ansätze diese neointimale, durch überschüssendes Einwachsen glatter Gefäßmuskelzellen getragene Hyperproliferation inhibitorisch zu beeinflussen. Radioaktive Stents, Stents mit Oberflächenbeschichtungen antiproliferativ wirkender Substanzen, spezielle, im Sinne der Rheologie optimierte Stentdesigns und Stentmaterialien, intrakoronare Brachytherapie und andere experimentelle Ansätze konnten das Problem der über-schüssenden, implantationsinduzierten (Mikrotrauma der Gefäßwand) Gewebsproliferation nicht vollständig verhindern. Aktuell wird, auch in unserer Klinik, der frühe Einsatz der intrakoronaren Brachytherapie unmittelbar nach Stentimplantation und der Einfluss antiproliferativ wirkenden Substanzen (Proteasominhibitoren) auf die Restenosierung untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die hochauflösenden Eigenschaften des Rasterkraftmikroskops genutzt werden, um die luminale Oberfläche der Koronarstents vor und nach Ballondilatation hinsichtlich der Oberflächenrauigkeit zu untersuchen. Bekanntermaßen werden Thrombozyten durch Oberflächenkontakt mit Fremdoberflächen direkt aktiviert, so dass zu vermuten war, dass mögliche Veränderungen der Oberflächenmorphologie der Koronarstents die Thrombozytenaktivierung beeinflussen. Wir untersuchten zunächst die luminale Oberflächenrauigkeit des unbehandelten und des ballondilatierten Stents am Beispiel des Palmaz-Schatz-Stents und versuchten im zweiten Schritt Prädispositionsstellen für die dehnungsabhängigen Rauigkeitsveränderungen der Stentoberfläche zu detektieren. Außerdem sollte untersucht werden inwieweit vitale Thrombozyten auf den präparierten und vorbehandelten Stentoberflächen adhärieren und ob morphologische, möglicherweise aktivitätsabhängige Unterschiede der adhärenen Thrombozyten zu erkennen sind. Der Vergleich dieser Ergebnisse des Palmaz-Schatz-Stents mit

denen anderer Stentdesigns (Sito, ACS-Multilink etc.) ist gegenwärtig Ziel der laufenden Untersuchungen und wird in dieser Arbeit nicht berücksichtigt. Entsprechend des unter 3.2.6 beschriebenen Procederes wurden die Stentoberflächen präpariert und rasterkraftmikroskopisch untersucht. Folgende Mikroskopierparameter wurden hierbei angewendet:

• Betriebsmodus	:	Contact-Mode
• Cantilever	:	PSI-Microlever Typ C
• Ermittelte Federkonstante des Cantilevers	:	0,016 N/m
• Scanfrequenz	:	3 (= 3 Zeilen/s)
• Auflagekraft d. Cantilever-Messtip-Systems	:	~ 4-5 nN
• Messsignalverstärkung (z-Gain)	:	1,2 - 1,5
• Messsignalverarbeitung	:	Topography-Mode
• Abbildungsareal	:	100 $\mu\text{m}^2$ bis 2 $\mu\text{m}^2$

Abbildung 78 zeigt die Topografie der luminalen Oberfläche eines nativen (nicht dilatierten, unbehandelten) Palmaz-Schatz-Stents. Im Auflösungsbereich der Rasterkraftmikroskopie detektiert man bei dieser, lichtmikroskopisch „glatten“ Oberfläche erhebliche Korrugationen die bis zu 0,9  $\mu\text{m}$  hoch sind. Bei weiterer Fokussierung in den jeweils zentralen Bereich des Bildes (50  $\mu\text{m}^2$  bis 2  $\mu\text{m}^2$ ) demaskieren sich metallische Korngrenzen mit ~100 Å Stufenhöhe (Pfeile), die beim Herstellungsprozess (Schmelz- und Abkühlprozess des 316L-stainless-steel-Materials) entstehen. Die bei 100  $\mu\text{m}^2$  sichtbaren Oberflächenstrukturen hingegen sind wahrscheinlich durch mechanische Beanspruchung des Stentmaterials während Herstellungsprozesses von „slotted-tube-stents“ (Walzen, Ziehen des Stentröhrchens etc.) zu erklären.

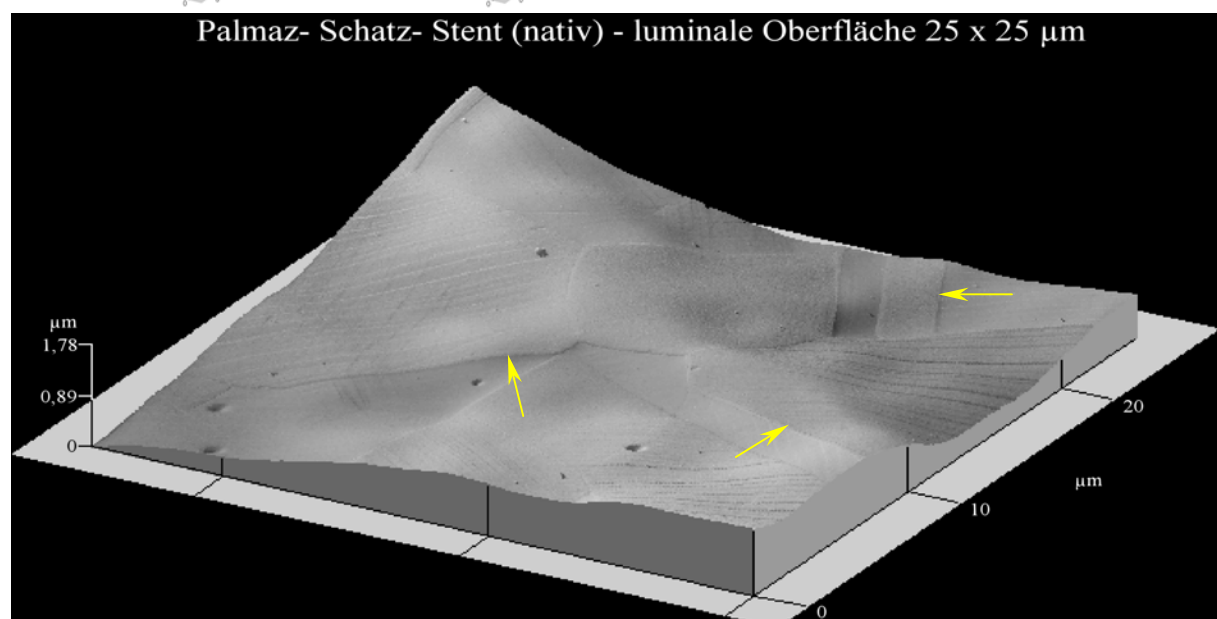


Abbildung 78

Entsprechend des unter 3.2.6.6 beschriebenen Vorgehens ermittelten wir an 30 zufällig auf der Stentoberfläche verteilten,  $25 \mu\text{m}^2$  großen Einzelbildern (siehe Abbildung 78) die integralen Rauigkeitsparameter. Die ermittelten Werte sind in Diagramm 1 aufgetragen.

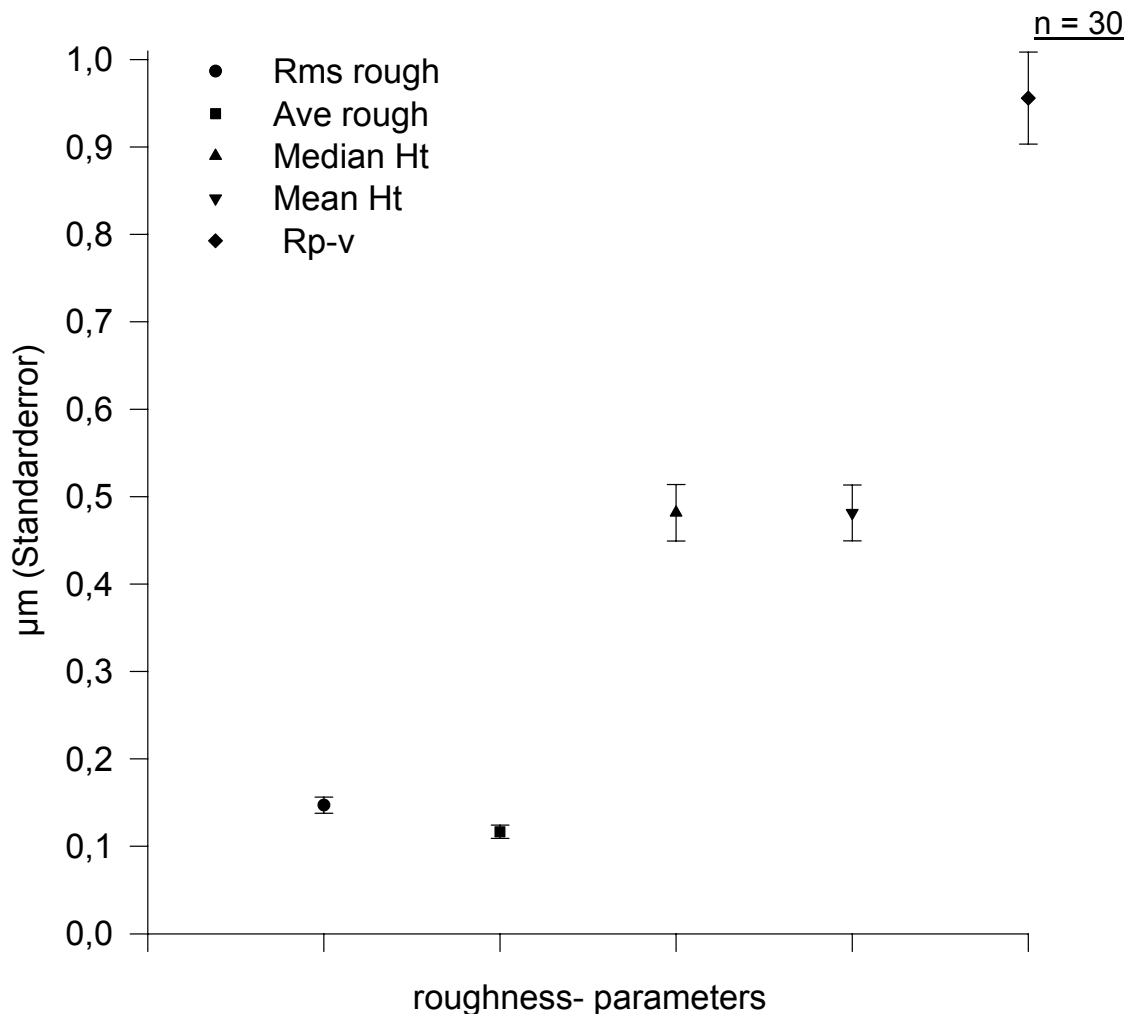


Diagramm 1

Nach Ermittlung der Oberflächen-Rauigkeitsparameter des unbehandelten Palmaz-Schatz-Stents wurden Stents der gleichen Herstellungscharge in einen Silikonschlauch mit entsprechendem Gefäßreferenzdurchmesser (3,5 mm Innendurchmesser) mittels Ballondilatation (mit 6 atm) implantiert. Danach wurde der Silikonschlauch longitudinal inzidiert und der entfaltete Koronarstent entnommen und wie o.b. präpariert. Wieder wurden 30 randomisierte,  $25 \mu\text{m}^2$  große Einzelscans der Stentoberfläche akquiriert und mittels PSI-Bildanalyse-Software (PSI-Proscan) ausgewertet. Hierbei zeigt sich, dass bei dilatierten Stents alle ermittelten Rauigkeitsparametern signifikant größer sind als bei den unbehandelten, nativen Stents (Abbildungen 79, 80 und Diagramm 2). Dies belegt eindeutig, dass die, mit der Implantation der Koronarstents einhergehende mechanische Beanspruchung durch die Ballondilatation zu einer signifikanten Zunahme der Oberflächenrauigkeit des Palmaz-Schatz-Koronarstents führt. Es ist zu vermuten, dass diese Erhöhung der Oberflächenrauigkeit neben vielen anderen Faktoren die Kontaktaktivierung von Thrombozyten an diesen Fremdoberflächen akzentuiert und somit als thrombogener Faktor wirken könnte.



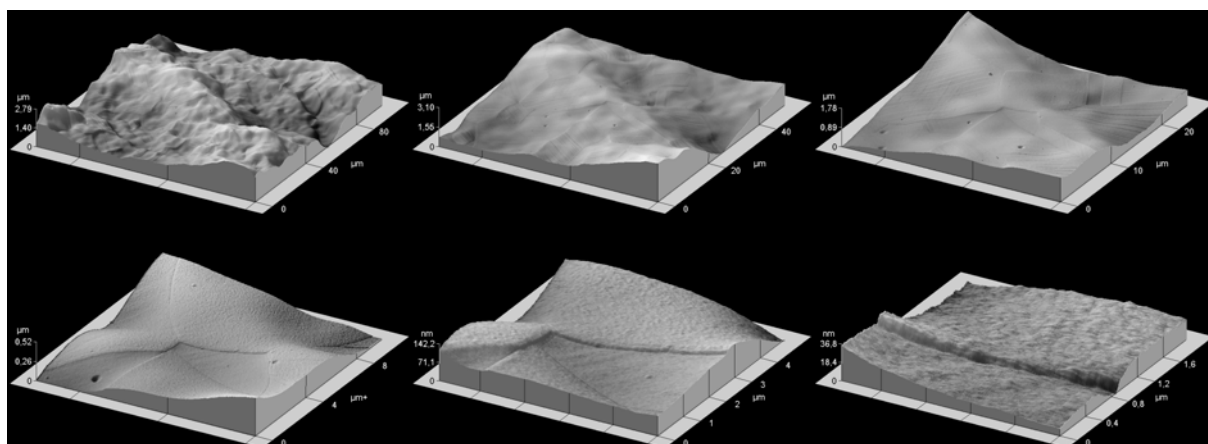


Abbildung 79  
Palmaz-Schatz-Stent undilatiert (nativ)

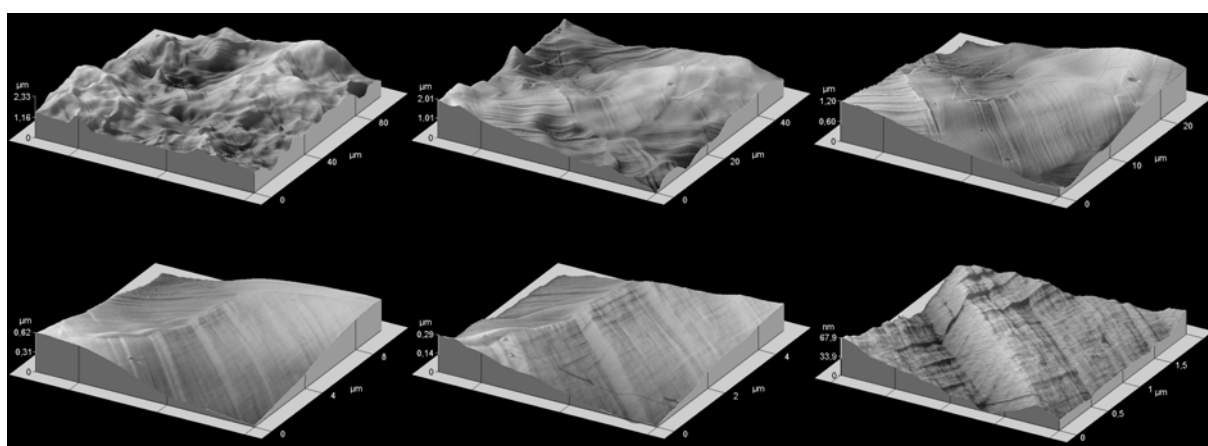


Abbildung 80  
Palmaz-Schatz-Stent dilatiert

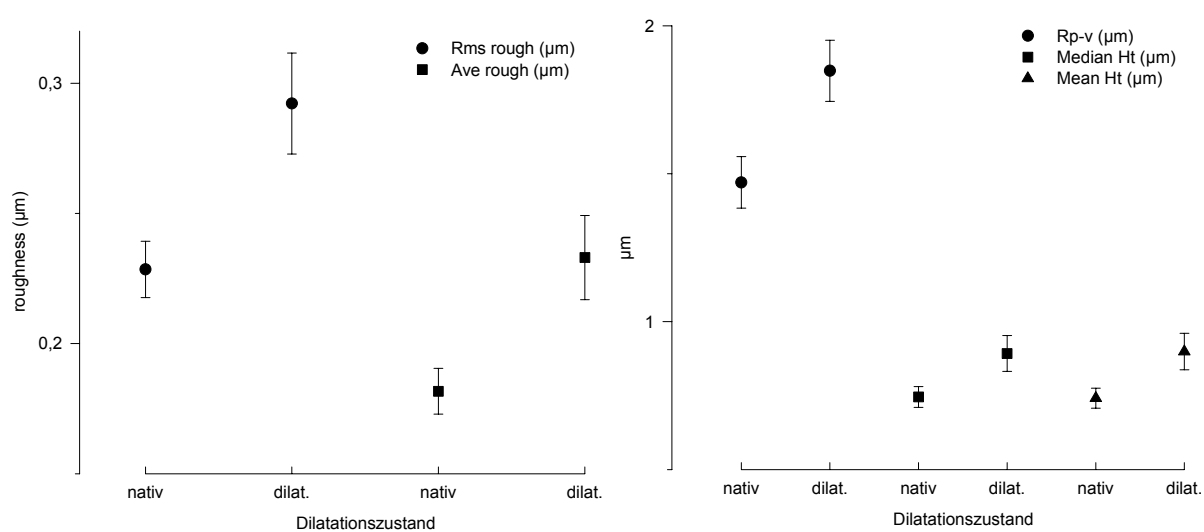


Diagramm 2

Um zu untersuchen, welche Prädilektionsstellen des Stents bei mechanischer Beanspruchung durch das Dilatationsprocedere besonders beansprucht werden, wiederholten wir die o.b. Analysen wie unter 3.2.6.6 beschrieben im Bereich der Quer- und Längssteg und der Kniebereiche des Stents (jeweils n=5). Es wurden die lokoregionären Rauigkeitsanalysen anhand der entscheidenden Rauigkeits-Parameter (mittlere Rauigkeit-  $R_{ave}$  und  $R_{rms}$ ) ermittelt. Hierbei ist respektive beider Parameter nachweisbar, dass die mittlere Rauigkeit im Knie- und Längsstegbereich durch die mechanische Beanspruchung der radialen Dilatation ansteigt, wogegen es im Bereich der Querstege des Palmaz-Schatz-Stents zu einer signifikanten Abnahme der Oberflächenrauigkeit kommt. Außerdem ist ableitbar, dass die integrale Rauigkeit des nativen Stents vordergründig durch die Rauigkeit der Querstegbereiche beeinflusst wird. Im Längssteg- und Kniebereich des nativen Stents liegt die Rauigkeit unter der integralen, gemittelten Gesamtoberflächenrauigkeit. Bei Dilatation werden diese Bereiche rauer (ansteigende  $R_{ave}$  und  $R_{rms}$ ), wogegen die, beim nativen Stent besonders rauen Oberflächenanteile (Querstege), durch die Ballondilatation "geglättet" werden.

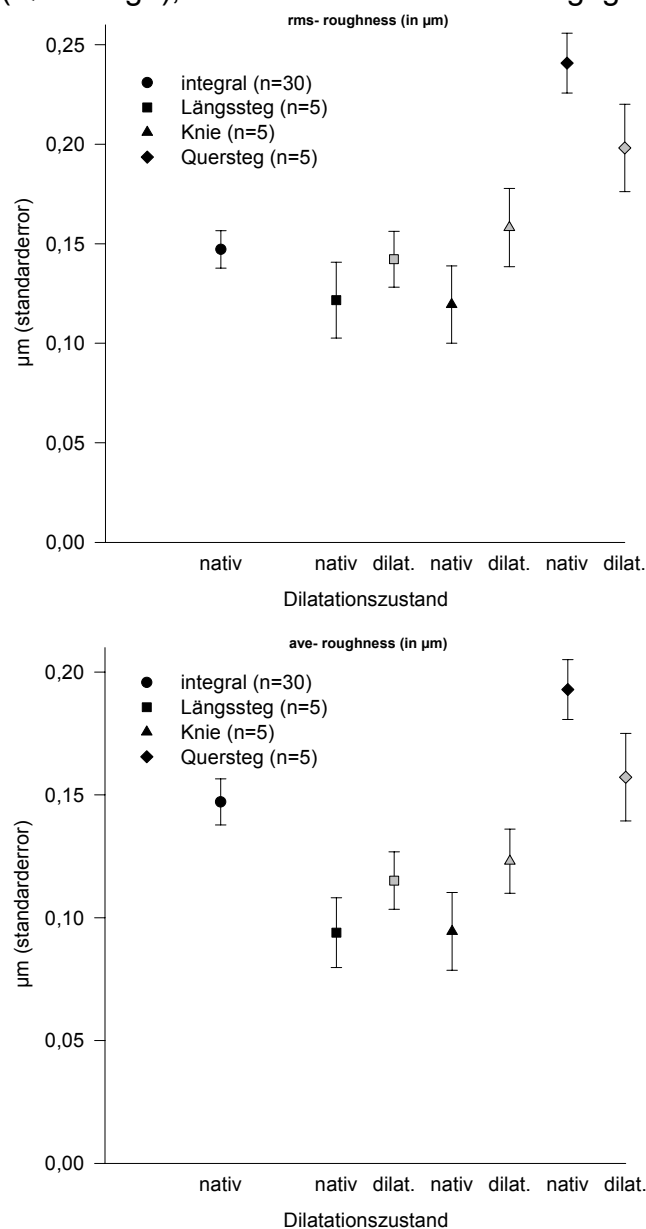


Diagramm 3

Letztlich sollte untersucht werden, ob humane vitale Thrombozyten (aus Thrombozytenkonzentraten, Institut für Transfusionsmedizin der Charité) auf den präparierten Stentoberflächen adhären und ob die luminale Oberflächentopografie des Stents einen Einfluss auf die Thrombozytenaktivierung und somit auf die Bindungsaffinität der Thrombozyten an diese Oberflächen hat. Abbildung 81 zeigt einen, auf der Palmaz-Schatz-Stentoberfläche adhären vitalen Thrombozyten, dessen Morphologie im Vergleich zu den auf Glasoberflächen adhären Thrombozyten keine wesentlichen Unterschiede zeigt. Die metallischen Korngrenzen (Pfeile,  $\sim 100$  Å-Stufen) scheinen für die zelluläre Ausrichtung des Thrombozyten auf der Stentoberfläche nicht entscheidend zu sein. Auch zytoplasmatische Zellausläufer und Filopodien entlang der detektierten Oberflächenstrukturen des Stents sind hier nicht nachweisbar. Um die Stärke der thrombozytären Adhäsion am Stentmaterial als Ausdruck der thrombozytären Kontaktaktivierung zu quantifizieren, ist es möglich, mittels „Lateral Force Microscopy“ (LFM) und modifizierter Nanolithografie die Kraft zu detektieren, die erforderlich ist, um den Thrombozyten vom Stentmaterial abzulösen. Die technischen Voraussetzungen stehen gegenwärtig in unserem Labor nicht zur Verfügung, so dass wir zur Klärung dieser Fragestellung eine Kooperation mit dem Institut für physikalische Chemie der Humboldt-Universität zu Berlin geplant haben.

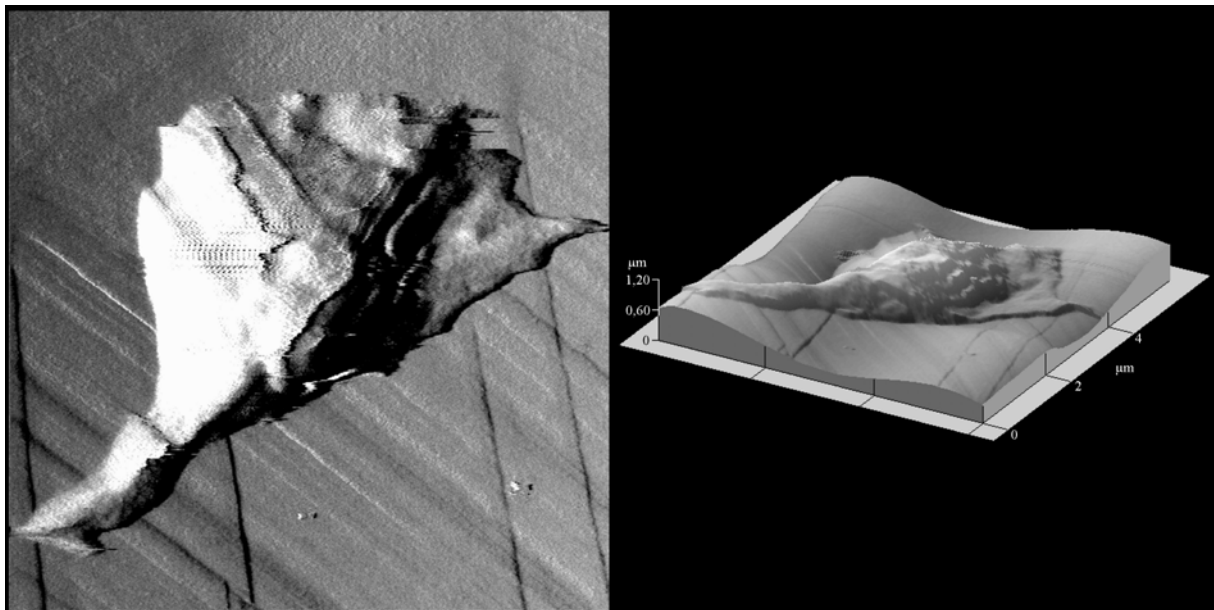


Abbildung 81

## 5 Diskussion

Die primäre Intention dieser Arbeit bestand darin, vitale, biologisch polymorphe, funktionell dynamische und durch andere hochauflösende Methoden - zumindest im vitalen Funktionszustand - nur unzureichend charakterisierte Zelloberflächen und komplexe Proteine (20-S Proteasom) mittels Rasterkraftmikroskopie abzubilden und zu untersuchen. Außerdem wurden die Materialoberflächen von Koronarstents (Palmaz-Schatz-Stent) hochauflösend untersucht, um Veränderungen der Rauigkeitsparameter vor und nach mechanischer Beanspruchung (Ballondilatation) zu detektieren, da die Oberflächenrauigkeit der Stents einen möglichen, die Thrombogenität und die damit verbundenen klinischen Probleme nach Koronarstentimplantation (akute Stentthrombose) beeinflussenden Faktor darstellt. Gegenwärtig existieren zahlreiche leistungsfähige mikroskopische Techniken, die Erhebung strukturanalytischer Daten von Zellen, Proteinen und Materialien im Hochauflösungsbereich ermöglichen. Methodisch bedingt kann bei diesen mikroskopischen Techniken der Vitalitätszustand der biologischen Proben häufig jedoch nicht erhalten werden (Elektronenmikroskopie). Andererseits ergibt sich das Problem, dass die Präparation selbst (z.B. Kryofixation, Proteindenaturierung bei Glutardialdehydfixation etc.) die mikroskopische Abbildung artifiziell überlagert. Die AFM-Abbildung macht die real-dreidimensionale Darstellung lebender biologischer Objekte in ihrer physiologischen Umgebung möglich. Dabei liegt das Auflösungsvermögen der Methode entsprechend der Literaturangaben deutlich über dem der Lichtmikroskopie und erreicht an speziell präparierten Proben und unter modifizierten Abbildungsbedingungen durchaus molekulare bis submolekulare Dimensionen. Dennoch generiert auch diese Methode Artefakte, welche vordergründig durch den Abbildungsprozess selbst entstehen. Die Analyse der beschriebenen kardiovaskulären Zellen sollte insbesondere unter diesem Aspekt erfolgen. In Kenntnis der Tatsache, dass das zu untersuchende biologische System (Zelloberflächen, Proteasom) funktionsassoziiert so polymorph ist, dass jegliche systembedingten Abbildungs- und Messartefakte des Rasterkraftmikroskops weitgehend eliminiert sein sollten, um eine Vergleichbarkeit der Messergebnisse an zellulären- und Proteinstrukturen überhaupt zu ermöglichen, wurden an den untersuchten kardiovaskulär relevanten Zellen, Proteinen und Materialien systematisch die optimalen, für den jeweiligen Objekttyp geeigneten Präparations- und AFM-Messmethoden entwickelt und evaluiert. Die kultivierten und gewebsgebundenen Zellen und Proteine, die in unterschiedlichen dynamischen Funktionszuständen vorlagen, wurden vermessen, morphologisch-deskriptiv beurteilt und, wenn möglich, mit Referenzmethoden validiert. Im folgenden werden exemplarisch die erzielten Untersuchungsergebnisse nochmals kursorisch beleuchtet, die Präparationsmethoden hinsichtlich ihres prozedural-assoziierten Fehlereinflusses auf die AFM-Untersuchung kritisch diskutiert und die methodisch bedingten Artefakte der Messmethode, in Anlehnung an die ausführlichen Erörterungen des Material- und Methodenteils dieser Arbeit erörtert. Generell gilt für alle Messergebnisse an vitalen Zellen und Proteinen die methodisch bedingte reziproke Proportionalität zwischen zeitlicher und räumlicher Auflösung (siehe 3.1.4.2). Vital intakte Zellen und Proteine erfahren während des hochauflösenden Messvorganges funktionsgebunden morphologische Veränderungen, weshalb die erste Zeile eines gescannten Bildes vitaler Zellen einen anderen zellulären Funktionszustand als die zuletzt akquirierte und somit auch eine abweichende Morphe repräsentiert. Wir betrachten also im rasterkraftmikroskopisch generierten,

statischen Bild vitaler Zelloberflächen und Proteine ein Kontinuum funktionsgebunden morphologischer Veränderungen der Zelloberfläche über den Zeitraum des Scanvorganges.

Die initial unter Raumbedingungen untersuchten exsikkierten BAEC dienten als Untersuchungsobjekt, um die in der Literatur für amorphe Festkörperoberflächen beschriebenen AFM-Messprotokolle zunächst an zellulären, organischen, avitalen Objekten zu reproduzieren und um erste Erfahrungen im Umgang mit zellulären Strukturen bei AFM-Untersuchungen zu sammeln. Die gewählten Scanparameter wurden wie beschrieben erarbeitet und, falls möglich, an Protokollen anderer Arbeitsgruppen (Barbee et al.) orientiert. Das für endotheliale, subkonfluent gewachsene Zellen typische Bild des „Kopfsteinpflaster“-ähnlichen Zellrasens mit dendritischen Zellausläufern, die bei maximaler Zell-Konfluenz nicht mehr nachweisbar sind, entspricht auch dimensionell den lichtmikroskopischen und elektronenmikroskopischen Daten für diese Zellpopulation. Die bei Fokussierung in den zentralen, granulär strukturierten Bereich der Endotheloberfläche erkennbaren perinukleär gelegenen, retikulär bis feingranulären Strukturen sind unter Umständen Fixationsartefakte, die durch den Trocknungsprozess der Zellen im Exsikkator entstanden sein können. Aufgrund der perinukleären Lage könnten dies aber auch zellarchitektonische Strukturen des Golgi-Apparates und der perinukleären Zysternen des endoplasmatischen Retikulums sein, die sich transmembranös aufgrund des reduzierten Zellurgors (präparatorisch bedingte Exsikkose) demaskieren. Eine dezidierte Abgrenzung dieser Strukturen gegenüber zytoskelettalen- und Zellmembranbestandteilen ist jedoch morphologisch-deskriptiv nicht möglich. Prinzipiell wäre eine Diskriminierung von zellulär-molekularen Oberflächenstrukturen nur mit immunhistologischen Methoden durchführbar. Die systembedingten AFM-Messartefakte (siehe Methodenteil) sind bei allen Versuchsansätzen durch regelmäßige, standardisierte Kalibrierverfahren des Systems minimiert und ihr Einfluss auf das akquirierte AFM-Abbild der Zelloberfläche ist daher als systematischer, alle generierten Abbildungen gleichermaßen betreffender Fehler zu betrachten. Dennoch sind Messtip (Doppelspitzen) und Cantilever (Veränderung der Federkonstante) während des Scanvorganges ebenfalls einer mechanischen Alteration unterlegen und verändern somit ihre, der Kalibrierung zugrundeliegenden mechanischen Eigenschaften. Auch der piezokeramische Scanner unterliegt bei Gebrauch, wie im Methodenteil beschrieben, sog. nichtlinearen Effekten (intrinsische Nonlinearität, Creeping, thermische Drift etc.). Somit existieren unabhängig vom polymorphen, sich dynamisch verändernden System der vitalen Zelloberfläche bereits drei nicht beeinflussbare Determinanten, die prozedural-assozierte Unschärfen und Artefakte generieren können [z.B. Doppelkonturen; „Tipartefakte“ - bei Strukturen, die kleiner sind als der Messtip ( $< 100 \text{ \AA}$ ) bildet die Struktur den Messtip ab und nicht wie angenommen, der Messtip die Struktur]. Zusätzlich zu diesen, durch Kalibrierung minimierten und systematischen Fehlereinflüssen ist aus unserer Sicht das zu untersuchende biologische Objekt durch seine funktionsgebunden dynamischen Veränderungen und Komplexität der bei weitem erheblichere Artefaktinduktor bei allen untersuchten biologischen Proben.

Bei der gleichen Zellpopulation (avitale, exsikkierte BAEC) unter zellphysiologischen Bedingungen bei  $37^\circ\text{C}$  wurde PBS als zellphysiologisches Medium während des mikroskopischen Messprozesses kontinuierlich ausgetauscht (Elektrolyt-homöostase). Unter Nutzung des Contact-Mode und der PSI-Microlever Typ C, konnten bei deutlich geringeren Scanfrequenzen und reduzierter Auflagekraft des Cantilever-Messtip-Systems im Topography-Mode das für endotheliale, subkonfluent

gewachsene Zellen typische Zellbild dreidimensional dargestellt und vermessen werden, wobei im Vergleich zur Abbildung unter Raumbedingungen jetzt eine höhere Auflösung bis in den Scanbereich von  $1,6 \mu\text{m}^2$  zu erzielen war. Damit konnten wir an zellulären Untersuchungsobjekten belegen, dass man deutlich höhere Auflösungen bei der AFM-Abbildung unter den Bedingungen der Flüssigkeitszelle erzielen kann (Reduktion der Adhäsionskräfte und der Physio- und Chemisorption). Wir fanden bei diesem Versuchsansatz allerdings auch, dass die Zellen der mechanischen Alteration durch den Scanvorgang im Contact-Mode bei höheren Auflagekräften des Cantilever-Tip-Systems nicht widerstanden und sich vom Objektträger lösten oder von der atomar spitzen Messnadel zerstört wurden. Weder die Wahl von Cantilevern mit geringer Federkonstante und folglich höherer Verwindungsinstabilität, noch die Anwendung des Non-Contact-Mode verbesserten die Stabilität der Zellen und die Abgrenzbarkeit zellulärer Strukturen im Hochauflösungsbereich. Damit zeichnete sich bereits ab, dass vitale zelluläre- und Proteinstrukturen im Hochauflösungsbereich mittels der bis dato verfügbaren AFM-Messmodi nicht sicher reproduzier- und abbildbar sein werden. In Anbetracht dieser, sich darstellenden Situation ist der Hinweis wesentlich, dass z.B. elektronenmikroskopisch gewonnene Strukturdaten maßgeblich von methodisch bedingten Fixationsartefakten beeinflusst werden und die elektronenmikroskopische Darstellung lebender Strukturen in physiologischer Umgebung prinzipiell nicht möglich ist. Der Vorteil der Rasterkraftmikroskopie gegenüber anderen hochauflösenden Mikroskopiemethoden käme folglich nur dann zur Geltung, wenn es präparatorisch und messtechnisch gelänge, vitale, unfixierte organische Zellen, Proteine etc. in ihrer physiologischen Umgebung zu untersuchen und hochauflösend, reproduzierbar, dreidimensional und innerhalb eines definierten Zeitrasters abzubilden. Erst damit wäre die Voraussetzung für funktionsassoziierte und pathophysiologische Untersuchungen der Zellmorphie gegeben. Nach Einführung des Tapping-Mode in unser messtechnisches Setup war der Weg bereitet, sich vitalen Zellen und Proteinen rasterkraftmikroskopisch zu nähern. Die Fluidität einer Zellmembran unfixierter Zellen implizierte, dass möglicherweise die im Contact-Mode auftretenden Lateralkräfte während des Scanvorganges die zu untersuchende Probe massiv alterieren. Trotz intensiver Bemühungen und systematischer Modifikation aller Scanparameter gelang es im Contact-Mode zu keiner Zeit, reproduzierbare Abbildungen von Membranoberflächenstrukturen vitaler Zellen zu generieren. Im Non-Contact-Mode war es unter den Bedingungen der Flüssigkeitszelle (also bei Messungen in zellphysiologischem Medium) zwar möglich, die Zelloberflächen ohne größere mechanische Alteration durch die Messspitze abzuscannen, jedoch war das Messsignal trotz maximaler elektronischer Verstärkung häufig unzureichend, um kontrastreiche mikroskopische Abbildungen zu erzielen (siehe 3.1.9).

An Glutaraldehyd-fixierten Zelloberflächen gelang es regelmäßig, Tapping-Mode-AFM unter zellphysiologischen Bedingungen zu vollziehen. Erst durch die Publikation von Putman et al. wurde klar, dass nur sehr hohe Tapping-Mode-Anregungsfrequenzen für die Abbildung unfixierter, fluider Zellmembranen anwendbar sind. Bei Fokussierung in die ROI einer vitalen BAEC unter zellphysiologischen Bedingungen erkennt man ein feingranuläres Muster auf der Membranoberfläche. Zytoskelettale und intrazelluläre Strukturen demarkieren sich bei diesen funktionell intakten Zellen nicht so ausgeprägt, wie bei den fixierten und dehydrierten Zellen, was die Hypothese stützt, dass intrazelluläre Strukturen sich transmembranös bei exsikkierten (reduzierter Zellturgor) Zellen "demaskieren". Bis zu einer Scanbereichsgröße von  $200 \text{ nm}^2$  waren an diesen vitalen Zellen Strukturen

abbildbar, die im Bereich komplexer Membranproteine einzuordnen sind. Interzellulär junctionale Strukturen (gap junction) waren hier exzellent identifizierbar, an denen bei weiterer Fokussierung (Auflösungsbereich bis  $5 \mu\text{m}^2$ ) tubuläre Konfigurate nachweisbar waren. Die elektronenmikroskopische Referenzuntersuchung nach Gefrierbruchpräparation zeigte morpho-analytisch erstaunliche Kongruenz zwischen den rasterkraftmikroskopisch und elektronenmikroskopisch untersuchten subzellulären Strukturen. Dies ist aus unserer Sicht ein Hinweis dafür, dass die Rasterkraftmikroskopie vitale subzelluläre Strukturen (gap junctions) unter physiologischen Bedingungen dimensionell vergleichbar genau abbildet, wie die etablierten mikroskopischen Hochauflösungsmethoden unter den Bedingungen des Hochvakuums.

Die biophysikalischen Elastizitätsmessungen an vitalen Zellen die von diversen Arbeitsgruppen (Hansma et al., Radmacher et al.) publiziert wurden, führten wir an vitalen BAEC wie dort beschrieben durch. Die reproduzierbar detektierten lokoregionalen Unterschiede der Zellmembranelastizität sind unserer Meinung nach Ausdruck lokoregional unterschiedlicher zytoskelettaler Ausstattung der Zellen und Ausdruck regional unterschiedlicher physiologischer Aktivität.

Die rasterkraftmikroskopische Untersuchung aortaler Endothelzellen im Gewebsverband wurde nach spezifischer Probenfixation (siehe 3.2.2) in physiologischem,  $37^\circ\text{C}$ -temperiertem PBS-Medium bei kontinuierlicher Medium-perfusion durchgeführt. Trotz Tapping-Mode und optimierten Scanparametern war eine destruktionsfreie Abbildung der Zellen nur bei minimalen Scanfrequenzen möglich, weshalb die rasterkraftmikroskopische Datenakquirierung pro Abbildung mindestens 35 Minuten in Anspruch nahm. Die aus diesem Grund notwendige kontinuierliche Medium-Perfusion der Flüssigkeitszelle generiert allerdings eine Strömung innerhalb dieser Messzelle, die sich auf das Cantilever-Tip-System des Rasterkraftmikroskops propagiert und somit perfusionsbedingte Messartefakte hervorruft, die bei der Analyse der AFM-Abbildungen in jedem Fall zu berücksichtigen sind. Eine Ausrichtung der gewebsgebundenen Endothelzellen entlang der Strömungsrichtung des Blutes war sicher nachweisbar, was auf die funktionelle Integrität der Zellen hinweist. Weshalb die rasterkraftmikroskopische Untersuchung am Aortenendothel des Kaninchens und der Ratte trotz langwieriger Optimierung aller Präparationsschritte und Messparameter nur unbefriedigend gelang, bleibt unklar. Möglicherweise bestehen Spezies-abhängige Unterschiede in der zytoskelettalen Architektur des Aortenendothels und der Basallamina, die dafür verantwortlich zu machen sind. Es bleibt zu vermuten, dass die Anwendung sehr hoher Tappingfrequenzen, wie in der Arbeit von Putman et al. beschrieben, fluide und sehr weiche Oberflächen formell besser rasterkraftmikroskopisch untersuch- und abbildbar macht („Aushärtungseffekt“ der Zellen durch hohe Tapping-Frequenz), allerdings die, durch das Messsystem applizierte Energie auf die Zelloberfläche offensichtlich Ausmaße annimmt, die eine massive Alteration bzw. Destruktion der Zellen durch das Messsystem induziert. Es ergibt sich folglich bei der AFM-Untersuchung vitaler Zellen die Notwendigkeit, eine optimale Kombination aus möglichst hoher Anregungsfrequenz bei noch nicht destrukturierend wirkender Anregungsenergie des Cantilever-Tip-Systems für den entsprechenden Zelltyp zu finden.

Zellen mit bekanntermaßen gut ausgebildetem, submembranös-zytoskelettalem System sind Fibrozyten und fibrozytenähnliche Zellen (FLC). Diese teils abgerundeten, teils langgestreckten, abgeflachten, mit membranartigen oder stachelförmigen Fortsätzen versehenen Zellen stehen in einem netzartigen

Zusammenhang und berühren sich mit ihren dendritischen Zytoplasmafortsätzen. Die hier rasterkraftmikroskopisch untersuchten Fibrozyten / Fibroblasten, zeigen als Ausdruck der funktionellen Integrität und Vitalität der untersuchten Zellen eine mitotische Teilung. Gut ist in der AFM-Abbildung das submembranös gelegene zytoskelettale Netzwerk der Fibrozyten zu erkennen. Insbesondere Zellen mit ausgeprägtem Zytoskelett sind problemlos und reproduzierbar im Tapping-Mode abbildbar. Im Gegensatz dazu sind Zellen mit schwächer ausgebildeter zytoskelettaler Matrix (z.B. Endothelzellen) der rasterkraftmikroskopischen Untersuchung deutlich schlechter zugänglich. Bis zu einer 500 nm<sup>2</sup>- großen Scanfläche auf der Zelloberfläche kann eine exzellente Strukturauflösung mittels Rasterkraftmikroskopie erreicht werden. Im Randbereich dieser Zellen sind feine granuläre Strukturen erkennbar, die globulären Proteinkomplexen entsprechen könnten, aber nicht sicher von möglichen Scanartefakten (Verunreinigungen, kristallisierte Nährmedium-elektrolyte etc.) zu trennen sind. Gegenwärtig sind zytomorphologische Untersuchungen mittels AFM an vitalen Zellen reproduzierbar, routinemäßig an Fibrozyten und FLC möglich, so dass aus unserer Sicht in der Zukunft funktionelle Untersuchungen von zelldynamischen Prozessen primär an diesen Zellmembranoberflächen vorgenommen werden sollten.

Die Primärisolation und AFM-Abbildung von Kardiomyozyten unterschiedlicher Spezies sowie die Präparation und rasterkraftmikroskopische Untersuchung von Zellkultur-Kardiomyozyten war von erheblichen prozedurbedingten Artefakten überlagert. Dennoch - die typische Querstreifung des Kardiomyozyten zeichnet sich durch die Sarkomer-Zellmembran deutlich ab. Es ist nach genauer Kalibrierung des Mikroskops, welche wir vor jeder Messung routinemäßig durchführten, eine Sarkomerlänge von 1,82 µm zu ermitteln. Offensichtlich ist somit, dass der hier vermessene vitale Kardiomyozyt trotz der Ca<sup>2+</sup>-freien Messumgebung in einem stark kontrahierten Zustand abgebildet wurde. Aufgrund dieser Ergebnisse zogen wir mikroskopische Referenzmethoden heran, um einen direkten Vergleich der Auflösungsmöglichkeiten der einzelnen mikroskopischen Verfahren anhand dieses Zelltyps zu erstellen. Die „environmental scanning electron microscopy“ (ESEM) avitaler Zellen und die konfokale Laserscan-Mikroskopie erbringen im Vergleich zur AFM-Technologie an vitalen Kardiomyozyten in zellphysiologischer Umgebung nachweislich kein überlegenes Auflösungsvermögen.

Die zellkernfreien Thrombozyten zeigen in enger Übereinstimmung mit den licht- und elektronenmikroskopisch beschriebenen Daten eine abgerundete, diskoide Zellform. Hinsichtlich der Größenverhältnisse imponieren die hier untersuchten Zellen etwas größer (~ 8 µm) als vorbeschrieben. Durch den Scanprozess (mechanisch) und durch typische Thrombozytenstimulantien (ADP) sind zytomorphologische Zeichen der thrombozytären Aktivierung (z.B. Exvagination von Membranvesikeln) rasterkraftmikroskopisch exzellent nachweisbar. Elektronenmikroskopische Referenzbilder aktivierter Thrombozyten zeigen, dass der Aktivitätszustand und die morphologische Veränderungen der Thrombozyten eng korrelieren. Diesen stimulationsabhängigen Phänotyp-Shift konnten wir rasterkraftmikroskopisch an vitalen Blutplättchen reproduzieren.

In einem weiteren Ansatz untersuchten wir komplexe Proteinstrukturen, speziell das 20S-Proteasom, rasterkraftmikroskopisch. Bei bereits bekannter, mittels Elektronenmikroskopie und Röntgenstrukturanalyse ermittelten Datenlage bezüglich des Proteasoms, erschien vor einiger Zeit im JMB eine Publikation, die das 20S-Proteasom strukturanalytisch unter nativen Bedingungen untersuchte. Außerdem wurde in dieser Arbeit mit einer neuen Methode (SPR = surface plasmon resonance)



die Substrat-Proteasom-Interaktion in Echtzeit gemessen. Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen strukturellen Befunde zeigen exzellente Übereinstimmung mit den bekannten strukturanalytischen Daten. Die AFM-Abbildung komplexer, oligomerer Proteine (20S Proteasom) wurde nach beschriebener Präparation bei Raumtemperatur und in physiologisch konzentriertem PBS-Medium vorgenommen. Wir fanden ca. 8-20 nm große globuläre Strukturen und identifizierten darunter Strukturen, die aus 5-7 globulären Domänen ringförmig zusammengesetzt waren und einen zentralen Kanal (Porus) bildeten. Die 3-dimensionalen Größenverhältnisse der abgebildeten Struktur wurden nach rasterkraftmikroskopischer Abbildung vermessen, wobei der Außendurchmesser der Ringstruktur 253-256 Å betrug. Im Vergleich zu den elektronenmikroskopischen Daten und Daten Röntgenstrukturanalyse des 20S-Proteasoms (Außendurchmesser 113 Å) ist die hier detektierte Ringstruktur hinsichtlich des Außendurchmessers 2,265 mal größer. Der Innendurchmesser des Ringes war 69 Å, so dass die kanalbildenden Proteindomänen 184 Å einnehmen. Der Porendurchmesser des Kanals ist in der Literatur mit 13–27 Å beschrieben. Der von uns rasterkraftmikroskopisch gemessene Kanaldurchmesser der detektierten Ringstruktur war deutlich größer (2,55 bis 5,3-fach größer). Die ermittelte Größendifferenz zwischen den bekannten strukturanalytischen Daten und den erhobenen AFM-Daten ist sicher multifaktoriell bedingt. Im Gegensatz zur elektronenmikroskopischen Analyse untersuchten wir hier rehydrierte Proteinstrukturen in physiologischem Medium. Hierdurch und durch unterschiedliche funktionelle Zustände des Proteasomenkomplexes (z.B. Kanalöffnung, bei Interaktion mit ubiquitinierten Proteinen) könnte diese, hier ermittelte Größendifferenz erklärbar sein. Dennoch belegen diese Messergebnisse, dass die Rasterkraftmikroskopie auch im submolekularen Auflösungsbereich, an komplexen Proteinstrukturen in der Lage ist, real-dreidimensionale Abbildungen zu generieren. Damit ist sie im Vergleich zu den anderen strukturanalytischen Methoden in jede Falle kompetitiv und als ergänzende analytische Methode in diesem Bereich anzusehen.

Im Rahmen der Untersuchungen an den interventionellen Materialien konnte gezeigt werden, dass die mit der Implantation von Koronarstents einhergehende mechanische Beanspruchung durch die Ballondilatation zu einer signifikanten Zunahme der Oberflächenrauigkeit des Palmaz-Schatz-Koronarstents führt. Es ist zu vermuten, dass diese Erhöhung der Oberflächenrauigkeit neben vielen anderen Faktoren die Kontaktaktivierung von Thrombozyten an diesen Fremdoberflächen akzentuiert und somit als thrombogener Faktor wirken könnte. Die Inkubation der nativen und dilatierten Stentoberflächen mit vitalen Thrombozyten sollte klären, ob die veränderte Oberflächenstruktur der Stents Einfluss auf die Kontaktaktivierung der Blutplättchen hat. Wie bereits beschrieben, waren humane, vitale Thrombozyten zuvor rasterkraftmikroskopisch auf Glasoberflächen untersucht worden, um zu klären, ob die zellmorphologischen Zeichen thrombozytärer Aktivierung mit dieser Methode detektierbar sind (s.o.). Die veränderten Oberflächeneigenschaften der Stents scheinen für die zelluläre Ausrichtung des Thrombozyten auf der Stentoberfläche und für die Aktivierung derselben nach morphologischen Kriterien offenbar nicht entscheidend zu sein. Die aktivitätsabhängig induzierbare Ausstülpung zytoplasmatischer Zellausläufer und Filopodien war hier nicht nachweisbar.

## 6 Ausblick

Die vorliegende Arbeit belegt zusammenfassend eindeutig, dass die Rasterkraftmikroskopie präferentiell für die hochauflösende Abbildung vitaler zellulärer Strukturen geeignet ist und, im Gegensatz zu anderen bildgebenden mikroskopischen Analyseverfahren, reproduzierbare Untersuchungen an ein und derselben vitalen Struktur im Zeitverlauf erlaubt. Darüber hinaus ermöglicht die Methode neben der rein morphologischen, real-dreidimensionalen Abbildung auch funktionelle Aussagen über funktionsassoziierte zelldynamische Prozesse (z.B. Migrationsbewegungen, Membran-Ausstülpungen, Zellkontraktionen etc.), über spezifische Oberflächenrauigkeiten und über bioelastische Zellmembraneigenschaften (Ermittlung der Nano-Indentation via "force-vs.-distance-corellation") zu treffen. Besonders gute und verlässlich reproduzierbare Ergebnisse zeigen AFM-Untersuchungen, die an Zellen mit hohem zytoskelettalen Anteil, z.B. Fibrozyten und Fibroblasten, durchgeführt wurden. Die von uns etablierten AFM-Messprotokolle, Messumgebungen und Präparationsmethoden für die untersuchten kardiovaskulär relevanten Zellen und Proteine erlauben eine funktionsassoziierte, morphologische Analyse vitaler Zellen und können aus unserer Sicht eine wesentliche methodische Bereicherung der mikroskopischen Techniken darstellen. In der Zukunft wird diese neue mikroskopische Technologie insbesondere bei der Identifizierung, Lokalisationsdiagnostik und Quantifizierung von membrangebunden Struktur- und Funktionsproteinen dienen. Hierbei kommen sterisch markierte Antikörper zum Einsatz, die spezifisch an die antigenen Epitope der Proteinstrukturen binden und am Fc-Anteil mit einer sterischen Struktur versehen sind, die mittels AFM-Technologie auf den Zellmembranoberflächen detektiert werden. Außerdem gibt es gegenwärtig erfolgversprechende Untersuchungsansätze, im Rahmen derer Rezeptor-Ligand-Interaktionen quantifiziert werden können. Hierfür wird ein spezifisch bindender Ligand (antigenes Epitop) an der Spitze des atomaren Messtips "konnektiert" und die spezifische Bindungskraft bei Interaktion mit dem zugehörigen Rezeptor über die Verformung des, über seine spezifische Federkonstante definierten Cantilevers abgeleitet. Hierbei dient also das AFM nicht als formelles Abbildungsinstrument, sondern als "Kraftmesser im Nanonewtonbereich".

## 7 Zusammenfassung

1981 entwickelten Gerd Binnig und Heinrich Rohrer bei IBM in Zürich das „Scanning Tunneling Microscope“. Damit wurde erstmalig das lokal hochaufgelöste Erfassen (bis in den atomaren Auflösungsbereich) von Objekteigenschaften im Nahfeld inerte Oberflächen möglich. Dies und insbesondere die Weiterentwicklung der Technologie und die spätere (1986) Etablierung der Rasterkraftmikroskopie (Atomic Force Microscopy - AFM), die diese Auflösungsmöglichkeiten der Rastersondenmikroskope auch an Non-Konduktoren (nicht leitende Untersuchungsoberflächen) realisieren konnte, stellte die Geburtsstunde einer neuen mikroskopischen Ära auf dem Gebiet der biomedizinischen Grundlagenforschung dar (Kapitel 1.3).

Das Studium der umfangreichen Literaturquellen zu diesem Thema und der direkte wissenschaftliche Kontakt und Erfahrungsaustausch mit anderen AFM-Arbeitsgruppen ließen im Initialstadium dieser vorliegenden Arbeit bereits erkennen, dass in der kardiovaskulären Grundlagenforschung zunehmend rasterkraftmikroskopische Versuchsansätze bearbeitet und kardiologisch interessante Fragestellungen mittels dieser Methode begleitend untersucht wurden (Kapitel 1.4).

Das Ziel dieser vorliegenden Arbeit bestand darin, kardiovaskulär relevante Zellen und Einzelproteine in vivo und interventionelle Materialien (Stents) rasterkraftmikroskopisch zu untersuchen, wobei die Etablierung und technisch aufwendige Optimierung dieser neuen mikroskopischen (Kapitel 3.1) und der zellspezifisch präparatorischen Methoden (Kapitel 3.2) an diesen Untersuchungsobjekten im Mittelpunkt stehen sollte.

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten endothelialen Zellen und H9C2-Myozyten stammten aus, in unserem Forschungslabor etablierten, immortalen Kulturzelllinien. Die adulten und Kardiomyozyten neonataler Ratten, die kardial- fibrozytären Zellen sowie die Thrombozyten wurden primär isoliert und als Primärkulturzellen kultiviert (Kapitel 3.2.3 und 3.2.4). Außerdem wurden vitale aortale Endothelzellen unterschiedlicher Tiere (Ratte, Meerschwein, Kaninchen) im Gewebsverband der thorakalen Aorta untersucht (Kapitel 4.2).

Die Zellen wurden initial, im Rahmen der Etablierungsphase mittels unterschiedlicher Methoden fixiert und nachfolgend rasterkraftmikroskopisch untersucht und dargestellt. Der Etablierungsprozess der Methodik begann mit der Abbildung luftgetrockneter Zellen (Kapitel 4.1.1) unter Raumbedingungen und setzte sich über verschiedene Modifikationen der Zellpräparation (z.B. Glutardialdehydfixation, Cryofixation), des Abbildungsmodus (Contact-, Non-Contact-, Tapping-Mode) und der Abbildungsbedingungen (Raumbedingungen, zellphysiologische Umgebung) fort, so dass schließlich die Abbildung vitaler Zellen (Kapitel 4.1.2 und Kapitel 4.2 – 4.5) in ihrer strukturellen und funktionellen Umgebung (z.B. aortale Endothelzellen im Gewebsverband) etabliert werden konnte und routinemäßig reproduzierbar war.

An stabilen oder künstlich stabilisierten Strukturen der o.g. vitalen Zellen wurden erste orientierende Messungen der bioelastischen Eigenschaften (Kraft-Abstands-Kurven, Kapitel 4.1.2.1) durchgeführt. Außerdem haben wir im Einzelfall, wenn technisch und apparativ möglich, andere hochauflösende strukturanalytische Verfahren (z.B. TEM) als mikroskopische Referenzuntersuchungen herangezogen (Kapitel 4.1.2; 4.4.1; 4.6), wobei z.T. erstaunliche Übereinstimmung zwischen den AFM-Daten und den strukturanalytischen Daten der Referenzmethoden nachweisbar waren.

Ein strukturell durch Elektronenmikroskopie und Röntgendiffraktionsanalyse sehr gut beschriebenes komplexes Funktionsprotein, das 20-S-Proteasom, wurde mittels der

Rasterkraftmikroskopie abgebildet und vermessen und die so gewonnenen strukturanalytischen Daten mit den bekannten strukturellen Abmessungen des Proteins verglichen (Kapitel 4.6). Die hierbei detektierten dimensional Abweichungen zwischen den AFM- assoziierten Daten und den bekannten strukturanalytischen Daten der Elektronenmikroskopie wurden im Kontext der funktionellen Integrität des Proteins und hinsichtlich möglicher methodischer Fehlereinflüsse (Kapitel 3.1.4.3) diskutiert.

Interventionelle Materialien (Stents), die in der täglichen kardiologischen Praxis Anwendung finden, sind hinsichtlich ihrer Ultrastruktur mittels dieser hochsensitiven Abbildungsmethode im Nahfeld von Objektoberflächen untersucht worden. Bezüglich ihrer nativen Oberflächenbeschaffenheit und ihrer mechanischen Alteration durch den Ballon-Dilatationsprozess wurden die Stents sehr detailliert qualitativ und quantitativ (Kapitel 4.7) beschrieben, wobei Prädilektionsstellen der prozedural-assoziierten mechanischen Beanspruchung der Stents durch die hier beschriebene, oberflächensensitive AFM- Methode sehr genau diskriminiert werden konnten.

Die präparierten Stents wurden weiterführend mit humanen Thrombozytenkonzentraten inkubiert und die Zell- Stentoberflächenkontakte sowie mögliche Stentoberflächen- induzierte Veränderungen der Thrombozyten sind morphologisch ausführlich beschrieben worden. Letztendlich wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die spezifische Aktivierung der vitalen Thrombozyten durch pharmakologische Stimulantien (z.B. ADP) mit der, durch den AFM-Abbildungsprozess induzierten Thrombozytenaktivierung (Kapitel 4.5) unter AFM-Bedingungen verglichen und diskutiert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen, dass mit der AFM-Technologie und objektorientiert optimierten Mess- und Präparationsmethoden ein neues mikroskopisches Analyseverfahren vorliegt, dass zum einen real-dreidimensionale morphologische Bildgebung bis in den submolekularen Auflösungsbereich an vitalen Zellen und präparierten Proteinkomplexen, zum anderen aber gleichermaßen Funktionsanalytik in Form von Messungen zelldynamischer Prozesse wie Migrationsbewegungen und Kontraktionen sowie visko-elastische Quantifizierung von Zellmembranen erlaubt. Der Vorteil gegenüber den meisten gegenwärtig verfügbaren mikroskopischen Methoden liegt in der neu eröffneten Möglichkeit der seriellen, wiederholten und stabil reproduzierbaren Messung an vitalen Zellen und zellulären Substrukturen. Insofern könnte in Zukunft diese neue Technologie eine methodische Bereicherung der mikroskopisch-morphologisch und funktionell orientierten Analysetechnik darstellen.

## 8 Liste häufig verwendeter Akronyme

- ADP	Adenosindiphosphat
- AE-TDA	Aminoethyl-Tricosadiamid
- AFM	Atomic Force Microscopy / Atomic Force Microscope*
- ATCC	American Tissue & Cell Company
- BAEC	bovine aortic endothelial cells
- BSA	bovine serum albumine
- CAFM	Contact-Mode-AFM*
- CCD	charged coupled device
- DMEM	Dulbeccos modified Eagle-Medium
- DNA	Desoxyribonukleinsäure
- DPPC	Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin
- DPPE	Dipalmitoyl-Phosphatidylethanolamin
- ESEM	Environmental Scanning Electron Microscopy*
- FCS	fetal calf serum
- FLC	fibrocyte like cell
- GIBCO™	Firma für Zellkulturmaterialien
- GP IIb-IIIa	Glykoprotein IIb-IIIa
- HBSS	Hank's balanced salt solution
- HOPG	highly oriented pyrolytic graphite
- HPI-layer	hexagonally packed intermediate-layer
- ICAFM	Intermittent-Contact-Mode-AFM* = TMAFM
- ICAM	intercellular adhesion molecule
- IGG	Immunglobulin G
- IGM	Immunglobulin M
- KHM	Krebs-Henseleit-Medium
- LFM	Lateral Force Microscopy*
- LPCVD	low pressure chemical vapor deposition
- LVESM	Low-Voltage Scanning Electron Microscopy*
- MDCK	Madin-Darby-Canine-Kidney
- NCAFM	Non-Contact-Mode-AFM*
- PBS	phosphate-buffered saline
- PCR	Polymerase-Kettenreaktion
- PSI	Park Scientific Instruments*
- PSPD	Positions sensitive Photodiode
- PTCA	percutane transluminale Koronarangioplastie
- PZT	Blei-Zirkonium-Titanat
- ROI	region of interest
- SEM	Scanning-Electron-Microscopy*
- SNOM	Scanning Nearfield Optical Microscope*
- SPR	surface plasmon resonance
- STM	Scanning Tunneling Microscopy / Scanning Tunneling Microscope*
- TEM	Transmission Electron Microscopy*
- TMAFM	Tapping-Mode-AFM*
- RNA	Ribonukleinsäure
- VCAM	vascular cell adhesion molecule

\* aufgrund der Authentizität wurden im Kontext englische Originaltermini verwendet.

## 9 Literatur

- <sup>1</sup> Waggoner B. Antony van Leeuwenhoek. <http://www.ucmp.berkeley.edu/history/leeuwenhoek.html>. 1999. Ref.-Typ: Internet Communication
- <sup>2</sup> Robenek H. Vorwort. in: Mikroskopie in Forschung und Praxis. GIT Verlag GmbH Darmstadt, 1995: 11.
- <sup>3</sup> Jones T. History of the Light Microscopy. <http://www.utm.edu/personal/thjones/hist/c1.htm>. 1999. Ref.-Typ: Internet Communication
- <sup>4</sup> Zierold K. Transmissionselektronenmikroskopie. in: Mikroskopie in Forschung und Praxis. GIT Verlag GmbH Darmstadt, 1995: 129.
- <sup>5</sup> Romeis B. Mikroskopische Technik. 17. Auflage, Urban und Schwarzenberg 1989: 87.
- <sup>6</sup> Reichelt R. Rasterelektronenmikroskopie und Röntgenmikroanalyse. in: Mikroskopie in Forschung und Praxis. GIT Verlag GmbH Darmstadt, 1995: 201.
- <sup>7</sup> Reichelt R. Rasterelektronenmikroskopie und Röntgenmikroanalyse. in: Mikroskopie in Forschung und Praxis. GIT Verlag GmbH Darmstadt, 1995: 213.
- <sup>8</sup> Engelhardt J, Knebel W. Konfokale Laserscanning Mikroskopie. in: Mikroskopie in Forschung und Praxis. GIT Verlag GmbH Darmstadt, 1995: 219-232.
- <sup>9</sup> Feynman RP. There's plenty of room at the bottom. <http://nano.xerox.com/nanotech/feynman.html>. 1959. Ref Type: Internet Communication
- <sup>10</sup> Binnig G, Rohrer H. Scanning tunneling microscope. *Helv Phys Acta* 1982; 55:726-735.
- <sup>11</sup> Binnig G, Rohrer H, Gerber C, Weibel E. Surface studies by scanning tunneling microscopy. *Phys Rev Lett* 1982; 49:57-61.
- <sup>12</sup> Hansma PK, Elings VB, Marti O, Bracker CE. Scanning tunneling microscopy and atomic force microscopy: application to biology and technology. *Science* 1988; 242(4876):209-216.
- <sup>13</sup> Zasadzinski JA, Helm CA, Longo ML, Weisenhorn AL, Gould SA, Hansma PK. Atomic force microscopy of hydrated phosphatidylethanolamine bilayers. *Biophys J* 1991; 59(3):755-760.
- <sup>14</sup> Binnig G, Quate CF, Gerber C. Atomic force microscope. *Phys Rev Lett* 1986; 56:930-933.
- <sup>15</sup> Marti O, Ribi HO, Drake B, Albrecht TR, Quate CF, Hansma PK. Atomic force microscopy of an organic monolayer. *Science* 1988; 239(4835):50-52.
- <sup>16</sup> Worcester DL, Miller RG, Bryant PJ. Atomic force microscopy of purple membranes. *J Microsc* 1988; 152(Pt 3):817-821.
- <sup>17</sup> Müller DJ, Schabert FA, Buldt G, Engel A. Imaging purple membranes in aqueous solutions at sub-nanometer resolution by atomic force microscopy. *Biophys J* 1995; 68(5):1681-1686.
- <sup>18</sup> Marti O, Elings V, Haugan M, Bracker CE, Schneir J, Drake B, Gould SA, Gurley J, Hellemans L, Shaw K, et al. Scanning probe microscopy of biological samples and other surfaces. *J Microsc* 1988; 152(Pt 3):803-809.
- <sup>19</sup> Singh S, Keller DJ. Atomic force microscopy of supported planar membrane bilayers. *Biophys J* 1991; 60(6):1401-1410.
- <sup>20</sup> Butt HJ, Downing KH, Hansma PK. Imaging the membrane protein bacteriorhodopsin with the atomic force microscope. *Biophys J* 1990; 58(6):1473-1480.
- <sup>21</sup> Alexander S, Hellemans L, Marti O, Schneir J, Elings V, Hansma PK. An atomic force microscope implemented using an optical lever. *J Appl Phys* 1989; 65:164-167.

- 22 Weisenhorn AL, Hansma PK, Albrecht TR, Quate CF. Forces in atomic force  
microscopy in air and water. *Appl Phys Lett* 1989; 54:2651-2653.
- 23 Butt HJ. Measuring electrostatic, van der Waals and hydration forces in  
electrolyte solution with an atomic force microscope. *Biophys J* 1991; 60:1438-  
1438.
- 24 Lindsay SM, Nagahara LA, Thundat T, Knipping U, Rill RL, Drake B, Prater CB,  
Weisenhorn AL, Gould SA, Hansma PK. STM and AFM images of nucleosome  
DNA under water. *J Biomol Struct Dyn* 1989; 7(2):279-287.
- 25 Murray MN, Hansma HG, Bezanilla M, Sano T, Ogletree DF, Kolbe W, Smith CL,  
Cantor CR, Spengler S, Hansma PK, et al. Atomic force microscopy of  
biochemically tagged DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90(9):3811-3814.
- 26 Hansma HG, Bezanilla M, Zenhausern F, Adrian M, Sinsheimer RL. Atomic force  
microscopy of DNA in aqueous solutions. *Nucleic Acids Res* 1993; 21(3):505-  
512.
- 27 Drake B, Prater CB, Weisenhorn AL, Gould SA, Albrecht TR, Quate CF, Cannell  
DS, Hansma HG, Hansma PK. Imaging crystals, polymers, and processes in  
water with the atomic force microscope. *Science* 1989; 243(4898):1586-1589.
- 28 Wigren R, Elwing H, Erlandsson R, Welin S, Lundstrom I. Structure of adsorbed  
fibrinogen obtained by scanning force microscopy. *FEBS Lett* 1991; 280(2):225-  
228.
- 29 Weisenhorn AL, Gaub HE, Hansma HG, Sinsheimer RL, Kelderman GL, Hansma  
PK. Imaging single-stranded DNA, antigen-antibody reaction and polymerized  
Langmuir-Blodgett films with an atomic force microscope. *Scanning Microsc*  
1990; 4(3):511-516.
- 30 Weisenhorn AL, Drake B, Prater CB, Gould SA, Hansma PK, Ohnesorge F,  
Egger M, Heyn SP, Gaub HE. Immobilized proteins in buffer imaged at molecular  
resolution by atomic force microscopy. *Biophys J* 1990; 58(5):1251-1258.
- 31 Hansma HG, Weisenhorn AL, Edmundson AB, Gaub HE, Hansma PK. Atomic  
force microscopy: seeing molecules of lipid and immunoglobulin. *Clin Chem*  
1991; 37(9):1497-1501.
- 32 Ill CR, Keivens VM, Hale JE, Nakamura KK, Jue RA, Cheng S, Melcher ED,  
Drake B, Smith MC. A COOH-terminal peptide confers regiospecific orientation  
and facilitates atomic force microscopy of an IgG1. *Biophys J* 1993; 64(3):919-  
924.
- 33 Edstrom RD, Meinke MH, Yang XR, Yang R, Elings V, Evans DF. Direct  
visualization of phosphorylase-phosphorylase kinase complexes by scanning  
tunneling and atomic force microscopy. *Biophys J* 1990; 58(6):1437-1448.
- 34 Karrasch S, Hegerl R, Hoh JH, Baumeister W, Engel A. Atomic force microscopy  
produces faithful high-resolution images of protein surface in an aqueous  
environment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(February 1994):836-838.
- 35 Lal R, Kim H, Garavito RM, Arnsdorf MF. Imaging of reconstituted biological  
channels at molecular resolution by atomic force microscopy. *Am J Physiol* 1993;  
265(3 Pt 1):C851-6.
- 36 Schabert FA, Engel A. Reproducible acquisition of Escherichia coli porin surface  
topographs by atomic force microscopy. *Biophys J* 1994; 67(6):2394-2403.
- 37 Yang J, Tamm LK, Tillack TW, Shao Z. New approach for atomic force  
microscopy of membrane proteins. The imaging of cholera toxin. *J Mol Biol* 1993;  
229(2):286-290.

- 38 Lal R, Yu L. Atomic force microscopy of cloned nicotinic acetylcholine receptor expressed in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90(15):7280-7284.
- 39 Papadopoulos V, Boujrad N, Ikonovic MD, Ferrara P, Vidic B. Topography of the Leydig cell mitochondrial peripheral-type benzodiazepine receptor. *Mol Cell Endocrinol* 1994; 104(1):R5-9.
- 40 Haydon PG, Henderson E, Stanley EF. Localization of individual calcium channels at the release face of a presynaptic nerve terminal. *Neuron* 1994; 13(6):1275-1280.
- 41 Butt HJ, Wolff EK, Gould SA, Dixon Northern B, Peterson CM, Hansma PK. Imaging cells with the atomic force microscope. *J Struct Biol* 1990; 105(1-3):54-61.
- 42 Henderson E, Haydon PG, Sakaguchi DS. Actin filament dynamics in living glial cells imaged by atomic force microscopy. *Science* 1992; 257(5078):1944-1946.
- 43 Parpura V, Haydon PG, Henderson E. Three-dimensional imaging of living neurons and glia with the atomic force microscope. *J Cell Sci* 1993; 104(Pt 2):427-432.
- 44 Oberleithner H, Giebisch G, Geibel J. Imaging the lamellipodium of migrating epithelial cells in vivo by atomic force microscopy. *Pflugers Arch* 1993; 425(5-6):506-510.
- 45 Oberleithner H, Schwab A, Wang W, Giebisch G, Hume F, Geibel J. Living renal epithelial cells imaged by atomic force microscopy. *Nephron* 1994; 66(1):8-13.
- 46 Haberle W, Horber JK, Ohnesorge F, Smith DP, Binnig G. In situ investigations of single living cells infected by viruses. *Ultramicroscopy* 1992; 42-44(Pt B):1161-1167.
- 47 Schoenenberger CA, Hoh JH. Slow cellular dynamics in MDCK and R5 cells monitored by time-lapse atomic force microscopy. *Biophys J* 1994; 67(2):929-936.
- 48 Fritz M, Radmacher M, Gaub HE. In vitro activation of human platelets triggered and probed by atomic force microscopy. *Exp Cell Res* 1993; 205(1):187-190.
- 49 Fritz M, Radmacher M, Gaub HE. Granula motion and membrane spreading during activation of human platelets imaged by atomic force microscopy. *Biophys J* 1994; 66(5):1328-1334.
- 50 Tomie T, Shimizu H, Majima T, Yamada M, Kanayama T, Kondo H, Yano M, Ono M. Three-dimensional readout of flash x-ray images of living sperm in water by atomic-force microscopy. *Science* 1991; 252(5006):691-693.
- 51 Eigler DM, Schweizer EK. Positioning single atoms with a scanning tunnelling microscope. *Nature* 1990; 344:524-526.
- 52 Betzig E, Trautmann JK, Wolfe R, Gyorgy EM, Finn PL. Near-field magneto-optics and high density data storage. *Appl Phys Lett* 1992; 61:142-144.
- 53 Hoh JH, Lal R, John SA, Revel JP, Arnsdorf MF. Atomic force microscopy and dissection of gap junctions. *Science* 1991; 253(5026):1405-1408.
- 54 Hoh JH, Sosinsky GE, Revel JP, Hansma PK. Structure of the extracellular surface of the gap junction by atomic force microscopy. *Biophys J* 1993; 65(1):149-163.
- 55 Lal R, John SA, Laird DW, Arnsdorf MF. Heart gap junction preparations reveal hemiplaques by atomic force microscopy. *Am J Physiol* 1995; 268(4 Pt 1):C968-77.



- 56 Apell HJ, Colchero J, Linder A, Marti O, Mlynek J. Na,K-ATPase in crystalline form investigated by scanning force microscopy. *Ultramicroscopy* 1992; 42-44(Pt B):1133-1140.
- 57 Paul JK, Nettikadan SR, Ganjeizadeh M, Yamaguchi M, Takeyasu K. Molecular imaging of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in purified kidney membranes. *FEBS Lett* 1994; 346(2-3):289-294.
- 58 Lacapere JJ, Stokes DL, Chatenay D. Atomic force microscopy of three-dimensional membrane protein crystals. Ca-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *Biophys J* 1992; 63(2):303-308.
- 59 Putman CA, van der Werf KO, De Grooth BG, van Hulst NF, Greve J. Viscoelasticity of living cells allows high resolution imaging by tapping mode atomic force microscopy. *Biophys J* 1994; 67(4):1749-1753.
- 60 Hansma PK, Cleveland JP, Radmacher M, Walters DA, Hillner PE, Bezanilla M, Fritz M, Vie D, Hansma HG, Prater CB. Tapping mode atomic force microscopy in liquids. *Appl Phys Lett* 1994; 64:1783-1740.
- 61 Martin LD, Vesenka JP, Henderson E, Dobbs DL. Visualization of nucleosomal substructure in native chromatin by atomic force microscopy. *Biochemistry* 1995; 34(14):4610-4616.
- 62 Schabert FA, Rabe JP. Vertical dimension of hydrated biological samples in tapping mode scanning force microscopy. *Biophys J* 1996; 70(3):1514-1520.
- 63 Radmacher M, Tillamnn RW, Fritz M, Gaub HE. From molecules to cells: imaging soft samples with the atomic force microscope. *Science* 1992; 257(5078):1900-1905.
- 64 Kordylewski L, Saner D, Lal R. Atomic force microscopy of freeze-fracture replicas of rat atrial tissue. *J Microsc* 1994; 173(Pt 3):173-181.
- 65 Lal R, John SR. Biological applications of atomic force microscopy. *Am J Physiol* 1994; 266(35):C1-C21.
- 66 Arnsdorf MF, Xu S. Atomic (scanning) force microscopy in cardiovascular research. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1996; 7(7):639-652.
- 67 Braet F, Seynaeve C, De Zanger R, Wisse E. Imaging surface and submembranous structures with the atomic force microscope: a study on living cancer cells, fibroblasts and macrophages. *J Microsc* 1998; 190(Pt 3):328-338.
- 68 Zachee P, Snauwaert J, Vandenberghe P, Hellemans L, Boogaerts M. Imaging red blood cells with the atomic force microscope. *Br J Haematol* 1996; 95(3):472-481.
- 69 Barberi R, Giocondo M, Bartolino R, Righetti PG. Probing the inner surface of a capillary with the atomic force microscope. *Electrophoresis* 1995; 16(8):1445-1450.
- 70 Pietrasanta LI, Schaper A, Jovin TM. Imaging subcellular structures of rat mammary carcinoma cells by scanning force microscopy. *J Cell Sci* 1994; 107(Pt 9):2427-2437.
- 71 Braet F, De Zanger R, Wisse E. Drying cells for SEM, AFM and TEM by hexamethyldisilazane: a study on hepatic endothelial cells. *J Microsc* 1997; 186(Pt 1):84-87.
- 72 Zhang PC, Bai C, Huang YM, Zhao H, Fang Y, Wang NX, Li Q. Atomic force microscopy study of fine structures of the entire surface of red blood cells. *Scanning Microsc* 1995; 9(4):981-989.

- 73 Yamashina S, Shigeno M. Application of atomic force microscopy to  
ultrastructural and histochemical studies of fixed and embedded cells. *J Electron*  
*Microsc Tokyo* 1995; 44(6):462-466.
- 74 Cricenti A, De Stasio G, Generosi R, Perfetti P, Ciotti MT, Mercanti D, van Hulst  
NF, Roomans GM. Atomic force microscopy of neuron networks. *Scanning*  
*Microsc* 1995;(695-700):-700).
- 75 Han W, Mou J, Sheng J, Yang J, Shao Z. Cryo atomic force microscopy: a new  
approach for biological imaging at high resolution. *Biochemistry* 1995;  
34(26):8215-8220.
- 76 Kasas S, Gotzos V, Celio MR. Observation of living cells using the atomic force  
microscope. *Biophys J* 1993; 64(2):539-544.
- 77 Ricci D, Grattarola M. Scanning force microscopy on live cultured cells: imaging  
and force-versus-distance investigations. *J Microsc* 1994; 176(Pt 3):254-261.
- 78 Rzany A, Bayer G, Bolz A, Schaldach M. AFM- Untersuchung der  
festkörperinduzierten Blutgerinnung in Abhängigkeit von den elektronischen  
Oberflächeneigenschaften. *Biomedizinische Technik* 1997; 42:43-44.
- 79 Grewe PH, Machraoui A, Deneke T, Barmeyer J, Müller KM. Strukturanalyse von  
16 verschiedenen Koronarstentsystemen. *Z Kardiologie* 1997; 86:990-999.
- 80 Siedlecki CA, Marchant RE. Atomic force microscopy for characterization of the  
biomaterial interface. *Biomaterials* 1998; 19(4-5):441-454.
- 81 Sagvolden G, Giaever I, Pettersen EO, Feder J. Cell adhesion force microscopy.  
*Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(2):471-476.
- 82 Operating Manual "PSI Autoprobe CP". Park Scientific Instruments 1993
- 83 Amrein M. Rastersondenmikroskopie. in: *Mikroskopie in Forschung und Praxis*.  
GIT Verlag GmbH Darmstadt, 1995: 234.
- 84 Amrein M. Rastersondenmikroskopie. in: *Mikroskopie in Forschung und Praxis*.  
GIT Verlag GmbH Darmstadt, 1995: 235.
- 85 Howland RS, Okagaki J. How to buy a scanning probe microscope ? – Key  
features to look when purchasing an SPM. Park Scientific Instruments 1993: 15-  
28
- 86 Van Cleef M, Holt SA, Watson GS, Myhra S. Polystyrene spheres on mica  
substrates: AFM calibration, tip parameters and scan artefacts. *J Microsc* 1996;  
181 Part 1:2-9.
- 87 Tortonese M. Cantilevers and tips for atomic force microscopy. *IEEE Eng Med*  
*Biol Mag* 1997; 16(2):28-33.
- 88 Moreira JE, Reese TS, Kachar B. Freeze-substitution as a preparative technique  
for immunoelectronmicroscopy: evaluation by atomic force microscopy. *Microsc*  
*Res Tech* 1996; 33(3):251-261.
- 89 Allen S, Davies MC, Roberts CJ, Tendler SJB, Williams PM. Atomic force  
microscopy in analytical biotechnology. *Trends Biotechnol* 1997; 15(3):101-105.
- 90 Cappella B, Baschieri P, Frediani C, Miccoli P, Ascoli C. Force-distance curves  
by AFM. A powerful technique for studying surface interactions [see comments].  
*IEEE Eng Med Biol Mag* 1997; 16(2):58-65.
- 91 Stohwasser R, Kuckelkorn U, Kraft R, Kostka S, Kloetzel PM. 20S-proteasome  
from LMP7 knock out mice reveals altered proteolytic activities and cleavage site  
preferences. *FEBS Letters* 1996; 383:109-113
- 92 Putman CA, van der Werf KO, De Grooth BG, van Hulst NF, Greve J.  
Viscoelasticity of living cells allows high resolution imaging by tapping mode  
atomic force microscopy. *Biophys J* 1994; 67(4):1749-1753.

- 93 Radmacher M, Fritz M, Kacher CM, Cleveland JP, Hansma PK. Measuring the viscoelastic properties of human platelets with the atomic force microscope. *Biophys J* 1996; 70(1):556-567
- 94 Dschietzig T, Richter C, Bartsch C, Stangl K. Flow-induced pressure differentially regulates endothelin-1, urotensin II, adrenomedullin and relaxin in pulmonary vascular endothelium. *Biochem Biophys Res Comm* 2001; 289: 245-251
- 95 Dschietzig T, Richter C, Bartsch C, Stangl K. The pregnancy hormone relaxin is a player in human heart failure. *FASEB J* 2001; 15(12): 2187-2195
- 96 Davies PF, Barbee KA. Endothelial cell surface imaging: insights into hemodynamic force transduction. *NIPS* 1994; 9:153-157.
- 97 Barbee KA, Davies PF, Lal R. Shear stress-induced reorganization of the surface topography of living endothelial cells imaged by atomic force microscopy. *Circ Res* 1994; 74(1):163-171.
- 98 Putman CA, van der Werf KO, De Grooth BG, van Hulst NF, Greve J. Viscoelasticity of living cells allows high resolution imaging by tapping mode atomic force microscopy. *Biophys J* 1994; 67(4):1749-1753.
- 99 Eppell SJ, Simmons SR, Albrecht RM, Marchant RE. Cell-surface receptors and proteins on platelet membranes imaged by scanning force microscopy using immunogold contrast enhancement. *Biophys J* 1995; 68(2):671-680.
- 100 Neagu C, van der Werf KO, Putman CA, Kraan YM, De Grooth BG, van Hulst NF, Greve J. Analysis of immunolabeled cells by atomic force microscopy, optical microscopy, and flow cytometry. *J Struct Biol* 1994; 112(1):32-40.
- 101 Kühnel W. Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie. Georg-Thieme-Verlag 1989; 7. überarbeitete und und erweiterte Auflage:148
- 102 Keidel WD. Lehrbuch der Physiologie. Georg-Thieme-Verlag 1985; 6. überarbeitete und und erweiterte Auflage:12.16
- 103 Gawaz MP. Das Blutplättchen. Georg-Thieme-Verlag 1999:4-11
- 104 Ciehanover A, Hod Y, Hershko A. A heat-stable polypeptide component of an ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1978; 81(4):1100-1105.
- 105 Hershko A, Ciehanover A. The ubiquitin system for protein degradation. *Annu Rev Biochem* 1992; 61:761-807.
- 106 Hochstrasser M. Ubiquitin, proteasomes, and the regulation of intracellular protein degradation. *Curr Opin Cell Biol* 1995; 7(2):215-223.
- 107 Goldberg AL. Functions of the proteasome: the lysis at the end of the tunnel. *Science* 1995; 268(5210):522-523.
- 108 Mayer RJ, Arnold J, Laszlo L, Landon M, Lowe J. Ubiquitin in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1089(2):141-157.
- 109 Jentsch S, Seufert W, Hauser HP. Genetic analysis of the ubiquitin system. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1089(2):127-139.
- 110 Hasselgren PO, Fischer JE. The ubiquitin-proteasome pathway: review of a novel intracellular mechanism of muscle protein breakdown during sepsis and other catabolic conditions. *Ann Surg* 1997; 225(3):307-316.
- 111 Falquet L, Paquet N, Frutiger S, Hughes GJ, Hoang Van K, Jaton JC. A human de-ubiquitinating enzyme with both isopeptidase and peptidase activities in vitro. *FEBS Lett* 1995; 359(1):73-77.

- 
- <sup>112</sup> Papa FR, Hochstrasser M. The yeast DOA4 gene encodes a deubiquitinating enzyme related to a product of the human tre-2 oncogene. *Nature* 1993; 366(6453):313-319.
- <sup>113</sup> Harris JR. Release of a macromolecular protein component from human erythrocyte ghosts. *Biochim Biophys Acta* 1968; 150(3):534-537.
- <sup>114</sup> Weissman JS, Sigler PB, Horwich AL. From the cradle to the grave: ring complexes in the life of a protein. *Science* 1995; 268(5210):523-524.

## Danksagung

Ich möchte die Gelegenheit nutzen, um allen an dieser Arbeit beteiligten Wissenschaftlern und wissenschaftlich-technischen Assistenten meinen besonderen Dank auszusprechen. Insbesondere gilt dieser Dank den Herren Johannes Hundertmark, Roland Heinze, Dieter Heinze und Dr. rer. nat. Markus Drechsler, die mir bei mikroskop- und computertechnischen Problemen stets hilfreich zur Seite standen. Mein ausdrücklicher Dank ist Frau Angelika Westphal, Frau Cornelia Bartsch und Herrn Dr. med. Christoph Günther vorbehalten, die mich maßgeblich bei den zell- und proteinpräparatorischen Arbeiten unterstützten. Abschließend sei es mir gestattet, mich bei Herrn OA Prof. Dr. med. Karl Stangl und Herrn OA Dr. med. Michael Laule zu bedanken, ohne deren initiale Ideen und unermüdliches Engagement hinsichtlich der wissenschaftlichen Leitung und finanziellen Organisation des kardiologischen Forschungslabors die Realisierung dieser Dissertationsarbeit nie möglich gewesen wäre.

## Erklärung an Eides Statt

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt und verfasst habe, sie auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und dass alle Stellen, die dem Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Publikationen entnommen sind, durch Angabe der Quellen als Entlehnung kenntlich gemacht und vollständig angegeben wurden.